

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. November 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/88178 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/00** [DE/DE]; Otto Kanning Strasse 11, 06120 Halle (DE).
SCHUTKOWSKI, Mike [DE/DE]; Am Glockenstuhl
(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/05461** 27, 06268 Ziegelroda (DE). **KÜLLERTZ, Gerhard**
[DE/DE]; Türkisweg 14, 06120 Halle (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 14. Mai 2001 (14.05.2001) (74) Anwalt: **VOSSIUS & PARTNER**; Siebertstrasse 4,
81675 München (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, JP, US.
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
(30) Angaben zur Priorität: 100 23 743.6 15. Mai 2000 (15.05.2000) DE NL, PT, SE, TR).
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.** [DE/DE]; Berlin (DE).
Veröffentlicht: — ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.
(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **FISCHER, Gunter**



WO 01/88178 A2

(54) Title: PEPTIDE SUBSTRATES FOR DIRECT MEASURING OF ENZYME ACTIVITIES

(54) Bezeichnung: PEPTIDSUBSTRATE ZUR DIREKTEN MESSUNG ENZYMATISCHER AKTIVITÄTEN

(57) Abstract: The present invention relates to peptide derivatives used to measure enzyme activities in homogenous reaction solutions by means of signals that are as direct and continuous as possible. Said invention also relates to kits, a method used to determine enzyme activities and to identify enzyme inhibitors or activators, and a method for selecting and using said peptide derivatives.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung stellt Peptidderivate bereit, die es erlauben, enzymatische Aktivitäten in homogenen Reaktionslösungen bei größtmöglicher Signaldirektheit und -kontinuität zu messen. Ferner betrifft die Erfindung Kits, Verfahren zur Bestimmung von Enzymaktivitäten, Identifizierung von Inhibitoren oder Aktivatoren von Enzymen, Screening-Verfahren sowie die Verwendung der Peptidderivate.

PEPTIDSUBSTRATE ZUR DIREKTEN MESSUNG ENZYMATISCHER AKTIVITÄTEN

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptidderivate, die es erlauben, die enzymatische Aktivität verschiedener Enzyme direkt zu verfolgen, sowie Kits, die die Peptidderivate enthalten. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Bestimmung von Enzymaktivitäten, zur Identifizierung von Inhibitoren oder Aktivatoren von Enzymen, Screening-Verfahren sowie die Verwendung der Peptidderivate.

Angesichts der zunehmenden Automatisierung von biologischen und biochemischen Testsystemen lassen sich heute große Probenmengen auf bestimmte Eigenschaften hin untersuchen. Ein Teilbereich solcher Massensuchtests (engl. high-throughput-screening) betrifft Systeme zur Bestimmung enzymatischer Aktivitäten. Dies dient einerseits der Bestimmung von Enzymaktivitäten in Proben, deren Aktivität unbekannt ist, und andererseits zur Identifizierung von Effektorverbindungen, die eine bestimmte Enzymaktivität inhibieren oder aktivieren.

Derartige für Massensuchtests geeignete Verfahren arbeiten vorzugsweise mit Substraten, bei denen der Reaktionsverlauf durch ein optisches Signal gemessen werden kann. Solche optischen Signale, wie z.B. Farbumschlag oder Zu- oder Abnahme einer Fluoreszenz, sind gut geeignet, um in automatisierten spektroskopischen Datenaufnamesystemen schnell und präzise den zeitlichen Verlauf der Umsetzung eines Substrats zu verfolgen. Hierbei lassen sich die Verfahren nach bestimmten Kriterien hinsichtlich der Detektionsmethode unterscheiden. Neben der Signalart (beispielsweise optisch, Fluoreszenz- oder Farbumschlag) sind dies vor allem Signaldirektheit und Signalkontinuität, die die Qualität eines Massensuchtestverfahrens zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen ausmachen. Eine größtmögliche Signaldirektheit ist wünschenswert. Das bedeutet, daß Signale, die möglichst direkt die zu beobachtende Reaktion anzeigen, vorteilhaft sind, um Störungen durch mögliche Einflußfaktoren gering zu halten. Oft sind allerdings Signale, die direkt von der zu beobachtenden Reaktion ausgehen, nur

schwer zu detektieren. Um trotzdem eine Detektion zu erreichen, werden Hilfsreaktionen verwendet, die in geeigneter Weise an die zu detektierende Reaktion gekoppelt werden und detektierbare Signale erzeugen. Mit der damit verbundenen geringeren Signaldirektheit werden Störeinflüsse in Kauf genommen, die die Messung erheblich verschlechtern können. Beispielsweise wurde versucht, die Aktivitätsmessung von Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerase (PPlase) durch Kopplung mit einer isomerspezifischen Proteolyse zu verbessern (Fischer, Biochim. Biophys. Acta 43 (1984), 1101; Fischer, Nature 337 (1989), 476). Für die Messung von Proteaseaktivität stehen dem Fachmann eine Vielzahl von geeigneten Substraten zur Verfügung, die eine Messung beispielsweise durch Freisetzung eines Farbstoffes ermöglichen (Barrett, Meth. Enzymol. 80 (1981), 561; Carter, Science 237 (1987), 394; Tanaka, Biochemistry 24 (1985), 2040; Horsthemke, Biochemistry 19 (1980), 2867; Jacotot, Eur. J. Biochem. 239 (1996), 248; Heinemeyer, EMBO J. 10 (1991), 555; Thornberry, Nature 356 (1992), 768; Walker, Cell 78 (1994), 343; Xiang, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 14559). Die durch die Hilfsreaktion erhöhte Sensitivität geht einher mit den Nachteilen der verminderten Signaldirektheit. Am Beispiel der oben angesprochenen PPlase kann dies folgende Auswirkungen auf die Messung der Enzymaktivität haben:

- Effektoren, deren Einfluß auf die PPlase ermittelt werden sollen, können inhibitorisch auf die Protease wirken;
- die Protease kann sich nachteilig auf die Aktivität der PPlase auswirken; oder
- die Protease greift in der Reaktion enthaltene Effektoren an.

Das genannte Beispiel verdeutlicht, wie sich durch die erhöhte Komplexität der Reaktionen die potentiellen Störeinflüsse vervielfältigen. Es wurden Versuche zu direkteren Messungen der PPlase-Aktivität unternommen. Ein Verfahren, das eine isomerspezifische chemische Verschiebung bei Anwendung von magnetischer Kernresonanzspektroskopie (NMR) nutzt (Kern, Biochemistry 34 (1995), 13598; Reimer, Biochemical J. 326 (1997), 181), erwies sich als zu wenig sensitiv. Bessere Ergebnisse lieferte ein Verfahren, bei dem geringe isomerspezifische spektroskopische Unterschiede von geeigneten PPlase-Substraten gemessen wurden (Janowski, Analytical Biochemistry 252 (1997), 299; Garcia-Echeverria, Biochem. Biophys. Res. Commun. 191 (1993); Garcia-Echeverria, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992), 2758). Allerdings konnte sich auch dieses Verfahren für breite

Anwendungen nicht durchsetzen, da es nur unter idealen experimentellen Bedingungen funktioniert. So beeinträchtigen beispielsweise geringe spektroskopische Störungen, wie sie bei der Verwendung von biologischen Proben nahezu unvermeidlich sind, die Aktivitätsmessung stark.

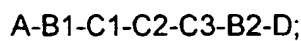
Das zweite Kriterium, von dem die Qualität der Aktivitätsmessung von Enzymen entscheidend abhängt, ist die Signalkontinuität. Dies betrifft sowohl die Genauigkeit der Meßdaten als auch die praktische Anwendbarkeit eines Verfahrens in Massensuchtests. Während beispielsweise bei der oben erwähnten Proteasemessung mit Hilfe einer Farbreaktion die kontinuierliche Meßwertaufnahme kein Problem darstellt, muß man bei anderen Enzymen oft auf diskontinuierliche Verfahren ausweichen. Dabei werden einem Reaktionsansatz fortlaufend Aliquots entnommen und in einer nachgeschalteten Nachweisreaktion ein meßbares Signal erzeugt. Eine solche Vorgehensweise ist bisher beispielsweise bei Aktivitätsmessungen von Proteinphosphatasen und Proteinkinasen notwendig. Neben der eingeschränkten Verfügbarkeit über Meßpunkte pro Zeiteinheit, die in einem größeren Meßfehler resultiert, bedeuten diskontinuierliche Verfahren einen vergleichsweise hohen Kosten- und Materialaufwand gegenüber kontinuierlichen Verfahren und dadurch eine beschränkte Einsetzbarkeit für Massensuchtests.

In vielen Verfahren zur Aktivitätsmessung von Enzymen stellt auch die Schaffung einer hinreichend homogenen Mischung im Reaktionsansatz ein Problem dar. Um reproduzierbare Daten erzielen zu können, müssen Enzym, Substrat und gegebenenfalls Effektorverbindung(en) homogen vermischt sein. Zumeist werden Vorinkubationslösungen hergestellt, die alle notwendigen Komponenten bis auf das Substrat enthalten. Die Reaktion wird durch Zugabe des Substrats gestartet. Hierbei erweist es sich oft als problematisch, in möglichst kurzer Zeit das Substrat homogen mit dem Vorinkubationsansatz zu vermischen. Dies gelingt naturgemäß nur dann in gewünschter Weise, wenn das Substrat im Endvolumen eine hohe Löslichkeit besitzt. Substrate, deren Konzentration sich im Endvolumen nahe dem Löslichkeitsprodukt befinden, lösen sich nur schlecht innerhalb kurzer Zeit. Aus diesem Grund sind solche Substrate weitgehend ausgeschlossen von der Anwendung in Enzymtests.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Substrate bereitzustellen, die die kontinuierliche Messung der Aktivität einer möglichst großen Bandbreite von Enzymen bei größtmöglicher Signaldirektheit ermöglichen, wobei die Messung in homogenen Enzym-Substrat-Mischungen stattfindet.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung Peptidderivate mit der allgemeinen Formel:



- wobei C1, C2 und C3 Verbindungen sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aminosäuren, N-Alkyl-Aminosäuren, Peptiden, Peptidderivaten, Peptoiden und Verbindungen, die sich in Peptidketten einbauen lassen;
- wobei B1 und B2 Verbindungen sind, die untereinander eine chemische Bindung ausbilden können;
- wobei bei Ausbildung der Bindung zwischen B1 und B2 das Peptidderivat in einem verspannten Zustand vorliegt;
- wobei sich die Bindung zwischen B1 und B2 leicht lösen läßt und der verspannte Zustand daraufhin in einen nicht verspannten Zustand übergeht; und
- wobei A und D Gruppierungen sind, die die Messung des Übergangs vom verspannten in den nicht verspannten Zustand oder die direkte Messung einer Enzymreaktion aufgrund der Änderung eines optischen Signals erlauben.

Peptidderivate der vorliegenden Erfindung eignen sich in besonderer Weise als Substrate zur Messung von Enzymaktivitäten. Die besondere Funktionsweise dieser Peptidderivate ist durch eine Konformationsänderung bedingt, die unabhängig von der zu messenden Enzymreaktion abläuft. Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung wird diese Konformationsänderung als Übergang von einem verspannten in einen nicht verspannten Zustand bezeichnet. Die erfindungsgemäßen Peptidderivate liegen zunächst in einem verspannten Zustand vor, der durch Ringbildung mittels Bindung zwischen den Verbindungen B1 und B2 stabilisiert wird. Der Begriff "verspannt" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine

Konformation der Verbindung(en) C1, C2 und/oder C3, die eine energetisch ungünstige Situation darstellt und instabil ist. Vorzugsweise ist das Peptidderivat im "verspannten" Zustand kein oder zumindest ein schlechtes Substrat für ein Enzym, dessen Aktivität gemessen werden soll. Im Sinne der vorliegenden Erfindung kann der Zugang des Enzyms zum Substrat auch allein durch die B1-B2-Bindung blockiert sein. Bei der erfindungsgemäßen Anwendung des Peptidderivats wird die Enzymreaktion durch Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 gestartet. Daraufhin geht das Peptidderivat von selbst in einen thermodynamisch günstigeren, nicht verspannten Zustand über. "Nicht verspannt" bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine energieärmere Konformation als der verspannte Zustand. Vorzugsweise ist das Peptidderivat im "nicht verspannten" Zustand für das zu untersuchende Enzym gut zugänglich und daher ein gutes Substrat für die vom Enzym katalysierte Reaktion. Vorzugsweise besitzt der nicht verspannte Zustand neue Bindungseigenschaften für Proteine gegenüber dem verspannten Zustand. Der Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand kann beispielsweise auf einer Konformationsänderung von einem cis- in einen trans-isomeren Zustand innerhalb des erfindungsgemäßen Peptidderivats beruhen. Für solche cis/trans-Isomere ist die Peptidbindung zwischen der Aminogruppe eines Prolinrests (oder Derivats davon) und der Carboxygruppe des benachbarten Aminosäurerests geeignet. Peptidderivate, die entsprechend für eine der Verbindungen C₁ bis C₃ einen Prolinrest bzw. ein Derivat davon enthalten, wurden in den Beispielen 1 bis 3 verwendet. Für die Ausbildung eines verspannten Zustands, der in einen nicht verspannten Zustand übergehen kann, können erfindungsgemäß weitere proteinchemische Effekte genutzt werden, die unabhängig von den besonderen Eigenschaften von Prolinpeptidbindungen sind. Ganz allgemein führt die Verspannung von Peptidsubstraten zu solchen Eigenschaften, die sich von denen unverspannter unterscheiden. Diese Unterschiede können so gravierend sein, daß Enzyme, wie z.B. Proteasen, die verspannte Substratform wesentlich schlechter proteolytisch spalten können als die unverspannte Form (Kazmaier, Organic Letters 1 (1999), 1763; Iwai, FEBS letters 459 (1999), 166-172; Bogdanowich-Knipp, J. Peptide Res. 53 (1999), 530-541; Gudmundsson, Pharm. Res. 16 (1999), 16-23).

Die Verbindungen C1, C2 und/oder C3 bestimmen die chemischen Eigenschaften des verspannten und des nicht verspannten Zustands des erfindungsgemäßen Peptidderivats. Vorzugsweise stellen sie zudem das Substrat für das zu untersuchende Enzym dar. Die Ausgestaltung der Verbindungen C1 bis C3 bestimmt hauptsächlich die Übergangsgeschwindigkeit vom verspannten in den nicht verspannten Zustand. In der erfindungsgemäßen Ausführungsform des Peptidderivats können C1, C2 und C3 Aminosäuren sein, wobei unter Aminosäure alle natürlich vorkommenden Aminosäuren, Modifikationen davon sowie künstlich synthetisierbare Aminosäuren verstanden werden. Beispiele für Aminosäuren sind die natürlichen L- und D-Aminosäuren oder Aminosäuren, die an der Seitenkette oder an der α -Amino- oder α -Carboxy-Gruppe substituiert sind. Beispiele für verwendbare modifizierte Aminosäuren sind Norleucin, Hydroxyprolin, Hydroxylysin, γ -Carboxyglutaminsäure, etc. Darunter fallen beispielsweise auch N-Alkylaminosäuren, d.h. Aminosäuren, die an der α -Aminogruppe mit einem Alkylrest substituiert wurden. N-Alkyl-Aminosäuren können auch an anderen Positionen modifiziert oder substituiert sein. Unter "Alkyl-" sind beispielsweise verzweigte oder unverzweigte Alkylreste mit variablen Kettenlängen zu verstehen. Desweiteren können die Aminosäuren nach Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, modifiziert werden. Ferner können die Verbindungen C1, C2 und C3 auch Peptide sein, die ihrerseits aus Aminosäuren bestehen, wie sie oben definiert sind. Die in den erfindungsgemäßen Peptidderivaten enthaltenen Peptide weisen vorzugsweise eine maximale Länge von drei Aminosäuren, besonders bevorzugt nicht mehr als zwei Aminosäuren auf. Anstelle von Peptiden können auch Peptidderivate oder Peptoide enthalten sein. Peptoide unterscheiden sich chemisch von Peptiden dadurch, daß sie neben Aminosäuren auch andere Verbindungen enthalten, die kovalent terminal an die Amino- und/oder Carboxygruppe und/oder an eine oder mehrere Seitenketten gebunden sind. Unter Peptidderivaten werden Peptide verstanden, die als Bestandteil solche Derivatisierungen von Aminosäuren enthalten, die sowohl die chemische Substitution einzelner Atome, funktioneller Gruppen als auch das Hinzufügen ganzer chemischer Moleküle durch kovalente Bindung an das Aminosäuregrundgerüst betreffen können. Der Begriff Peptidderivate beinhaltet somit alle chemischen Änderungen und Zusätze, die an Aminosäuren/Peptiden

vorgenommen werden können. Weiterhin können C1, C2 und/oder C3 auch Peptidmimetika, Aminobenzoesäuren oder heterocyclische Verbindungen, die mit Amino-und/oder Carboxylgruppen substituiert sind, darstellen.

Allgemein sind Methoden zur Herstellung der erfindungsgemäßen Peptidderivate dem Fachmann bekannt und in der Literatur beschrieben. Herstellungsverfahren für homo- oder heteromere Peptide kann man beispielsweise Jakubke (Peptide. Chemie und Biologie, SPEKTRUM-AKADEMISCHER VLG, 1196 VIII, ISBN: 3-8274-0000-7); Bodanzsky (Peptide Chemistry: A Practical Textbook, Springer Verlag, ISBN: 0387566759) oder Gutte (Editor, Peptides: Synthesis, Structures, and Applications (1995), Academic Press, ISBN: 0123109205) entnehmen. Die erfindungsgemäßen Peptidderivate können auch wie in den Beispielen beschrieben hergestellt werden.

Die Verbindungen B1 und B2 können untereinander eine chemische Bindung ausbilden. Diese chemische Bindung ist vorzugsweise kovalenter Natur. Die Verbindungen B1 oder B2 können gleich oder unterschiedlich sein. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist sowohl B1 als auch B2 Cystein. Die Ringbildung des Peptidderivats, die die verspannte Form erzeugt, erfolgt hierbei durch eine Disulfidbindung zwischen den Cysteinen. Techniken zur Erzeugung derartiger Disulfidbindungen innerhalb von Peptiden sind beispielsweise in Maruyama (Peptides 20(7) (1999), 881-884) und Kiso (Brazilian Journal of Medical and Biological Research 27(12) (1994), 2733-2744) beschrieben. Die nach diesen oder ähnlichen Verfahren hergestellten verspannten Peptidderivate sind über eine längere Zeit lagerbar.

In der erfindungsgemäßen Ausführungsform der Peptidderivate ist die Bindung zwischen B1 und B2 leicht lösbar. Das Lösen der Bindung kann durch physikalische oder chemische Einflüsse erfolgen. Unter physikalischen Einflüssen sind beispielsweise Licht, wie z.B. ein kurzzeitiger Lichtblitz oder andere elektromagnetische Strahlungen zu nennen. Um die Bindung zwischen B1 und B2 für solche Einflüsse angreifbar zu machen, muß sie photosensibel ausgeführt sein. Beispiele für derartige photosensible Bindungen sind Aryl-Disulfide, die sich beispielsweise zwischen Verbindungen wie 4-Mercapto-phenylalanin-haltigen

Peptiden ausbilden (Lu, J. Am. Chem. Soc. 119 (1997), 71-73). Laser-induzierte Photolyse erzeugt innerhalb von wenigen Picosekunden Tolythiyl-Radikale (Volk, J. Phys. Chem. B, 101 (1997), 8607). Unter chemischen Einflüssen sind beispielsweise Änderungen der Reaktionslösung, die den pH-Wert betreffen, einen Übergang von einem oxidativen Milieu in ein reduzierendes Milieu oder umgekehrt bewirken, die sich von Zugabe von Säuren, Laugen, Reduktionsmitteln oder Oxidationsmitteln bewerkstelligen lassen. Weitere chemische Einflüsse sind im Sinne der Erfindung Reagenzien, die bei Zugabe in die Reaktionslösung die Bindung zwischen B1 und B2 direkt angreifen. Beispiele für derartige Reagenzien sind Trialkylphosphine. Vorzugsweise haben die zum Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 zugesetzten Chemikalien keinerlei oder nur vernachlässigbar kleine Auswirkungen auf die zu messende Reaktion oder auf die Detektion.

Somit ist in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Peptidderivats das Verfahren zur Lösung der Bindung zwischen B1 und B2 die Anwendung eines Lichtblitzes oder einer anderen elektromagnetischen Strahlung oder die Zugabe eines chemischen Reagens.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 durch die Zugabe eines Reduktionsmittels erreicht. Beispielsweise bewirkt das Reduktionsmittel die Reduktion von Disulfidbrücken, die zwischen zwei Cysteinresten bestehen. Beispiele für Reduktionsmittel, die im Rahmen der Erfindung eingesetzt werden können, sind Dithiothreitol (DTT), DTE, Tri-n-Butyl-Phosphin und Tri-Carboxyethyl-Phosphin.

Die erfindungsgemäßen Peptidderivate enthalten zwei in der allgemeinen Formel mit A und D bezeichnete Gruppierungen, die die Messung des Überganges vom verspannten in den nicht verspannten Zustand oder die direkte Messung einer Enzymreaktion aufgrund einer Änderung eines optischen Signals erlauben.

Diese Gruppierungen enthalten im Sinne der vorliegenden Erfindung einen Farbstoff. Weiterhin können die Gruppierungen andere chemische Verbindungen enthalten, wie beispielsweise einen Aminosäurerest, die mit dem Farbstoff kovalent verbunden sind. Vorzugsweise liegt eine solche andere Verbindung zwischen dem Farbstoff und

der benachbarten Verbindung B₁ oder B₂. Vorzugsweise besteht die Gruppierung A und/oder D ausschließlich aus dem Farbstoff. Die im Sinne der vorliegenden Erfindung in A und D enthaltenen Farbstoffe, reagieren auf Bestrahlung mit Licht einer gewissen Wellenlänge oder eines gewissen Spektrums mit der Emission von Licht, das sich von dem eingestrahnten Licht detektierbar unterscheidet. Die Wellenlängen bzw. Spektren des Lichts können dabei im infraroten, sichtbaren und/oder ultravioletten Wellenlängenbereich liegen. Dies gilt sowohl für die Bestrahlung als auch für die Emission. Neben der Bestrahlung können die Farbstoffe in A und D des erfindungsgemäßen Peptidderivats auch durch andere physikalische oder durch chemische oder biologische Energiequellen zur Lichtemission angeregt werden. Im Sinne der Erfindung können andere physikalische Quellen beispielsweise andere elektromagnetische Strahlen als Licht, elektrische Felder, etc. sein. Chemische oder biologische Lichtemission kann beispielsweise unter Ausnutzung eines Effektes wie Chemo-, Biolumineszenz oder Phosphoreszenz erfolgen.

Dem Fachmann sind Farbstoffe, die den oben genannten Eigenschaften entsprechen und in den Gruppierungen A und D einsetzbar sind, bekannt. Eine große Auswahl solcher Verbindungen sind im Stand der Technik beschrieben und lassen sich beispielsweise dem "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" (R.P. Haugland, ISBN 0-9652240-0-7) entnehmen. Desweiteren sind Verfahren bekannt, mit denen Peptide oder Peptidderivate N- oder C-terminal mit den Gruppierungen A und D gekoppelt werden können, wie beispielsweise beschrieben in Jean (Biochem. J. 307 (1995), 689), Spetzler (J. Peptide Sci. 4 (1998), 128), Wang (Bioorg. Med. Chem. Lett. 2 (1992), 1665), Wang (Tetrahedron Lett. 31 (1990), 6493), Meldal & Svendsen (J. Chem. Soc. Perkin Trans.I (1995), 1591) oder Bratovanova & Petkov (Anal. Biochem. 162 (1987), 213).

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Peptidderivate, wobei A und D Gruppierungen sind, die Farbstoffe enthalten, die bei Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge fluoreszieren, oder Gruppierungen sind, die Farbstoffe enthalten, die eine Farbänderung zeigen. Die bekanntesten Signalarten, die zur Detektion enzymatischer Reaktionen herangezogen werden, sind Änderungen, die mittels optischer Methoden erfaßt werden können. Der große Vorteil solcher

Methoden ist das Vorhandensein unterschiedlichster spektroskopischer Geräte, die es ermöglichen, an Hand der Farbänderung die enzymatische Aktivität zu beschreiben. Unter den lichtoptischen Signaländerungen sind besonders solche von Vorteil, die zu einer Änderung der Fluoreszenz führen. Der größte Vorteil solcher Fluoreszenzmethoden liegt in ihrer, dem Fachmann bekannten großen Empfindlichkeit. Von besonderer Empfindlichkeit sind hier wieder solche Methoden, bei denen, ausgelöst durch die enzymatische Reaktion, das Fluoreszenzsignal zunimmt. Die hohe Empfindlichkeit von Fluoreszenzmethoden beruht hauptsächlich auf der allgemein bekannten höheren Nachweisempfindlichkeit von Fluoreszenzfarbstoffen, verglichen mit nicht fluoreszierenden Farbstoffen.

Unter Gruppierungen, die Farbstoffe enthalten, die eine Farbänderung zeigen, sind vorzugsweise Verbindungen zu verstehen, die selbst ein Substrat für das zu messende Enzym darstellen und bei denen die Farbänderung durch die enzymatische Katalyse hervorgerufen wird. Bei der Abwesenheit einer enzymatischen Aktivität wird in dem Fall allerdings keine Änderung des optischen Signals detektiert. Dem Fachmann bekannte Beispiele sind z.B. Substrate für Proteasen, bei denen nach Zugabe der Protease zu einem geeigneten Substrat durch die einsetzende Proteolyse ein Farbstoff freigesetzt wird (Barrett, Meth. Enzymol. 80 (1981), 561; Carter, Science 237 (1987), 394; Tanaka, Biochemistry 24 (1985), 2040; Horsthemke, Biochemistry 19 (1980), 2867; Jacotot, Eur. J. Biochem. 239 (1996), 248; Heinemeyer, EMBO J. 10, (1991) 555; Thornberry, Nature 356, (1992) 768; Walker, Cell 78 (1994), 343; Xiang, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 14559). Als Maß der enzymatischen Aktivität dieser proteolytischen Aktivität kann die freigesetzte Menge Farbstoff je Zeiteinheit benutzt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Peptidderivate, wobei sich die Fluoreszenz der in den Gruppierungen enthaltenen fluoreszierenden Farbstoffe im verspannten Zustand des Peptidderivats durch einen Quench-Effekt aufhebt oder vermindert.

Die räumliche Nähe zwischen A und D im verspannten Peptidderivat bewirkt einen Quench-Effekt, der zur Folge hat, daß die Lichtemission eine der beiden Gruppierungen durch die Wirkung der anderen Gruppierung herabgesetzt oder ganz

aufgehoben wird. Unter "Quench-Effekt" wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein physikalisch-chemischer Effekt verstanden, bei dem die Anregungsenergie, die zur Lichtemission des Fluoreszenzfarbstoffes führen kann, durch die räumliche Nähe des Quenchers mitabsorbiert wird, und so die Lichtemission des Fluoreszenzfarbstoffes gemindert wird. Die Definition der Farbstoffe, die das erfindungsgemäße Peptidderivat bzw. die Gruppierung A oder D enthalten kann, umfaßt daher auch Fluoreszenzfarbstoffe, die als Quencher dienen. Bei vergrößerter Distanz zwischen A und D im nicht verspannten Zustand des Peptidderivats ist dieser Quench-Effekt herabgesetzt oder gänzlich aufgehoben, so daß die Lichtemission der vormals gequenchten Verbindung nun größer ist als im verspannten Peptidderivat.

Aus Gründen der einfacheren Darstellung wird im Folgenden A als die Gruppierung definiert, deren optisches Signal gemessen wird, und D als die Gruppierung, die A quencht. Die im Folgenden dargestellten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind so zu verstehen, daß A und D austauschbar sind, so daß auch D durch A gequench werden kann. Dem Fachmann sind Paare von fluoreszierenden Verbindungen, bei denen die eine Verbindung die andere quencht bekannt.

Insbesondere bevorzugt sind Peptidderivate der oben beschriebenen Ausführungsformen der Erfindung, wobei A eine Gruppierung ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: 2-Aminobenzoessäure, D,L-2-Amino-3-(7-methoxy-4-cumaryl)propansäure, Coumarin, Quinolinon, 4-(4'-Dimethylamino-benzenazo)benzoessäure (Dabsyl) und 5-(2'-Aminoethylamino)naphtalensulfonsäure (EDANS); und D eine Gruppierung ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: 4-Nitroanilin (=para-Nitroanilin), Aminoacyl-4-Nitroanilin, 3-Nitrotyrosin (meta-Nitrotyrosin), Aminoacyl-3-Nitrotyrosin, Tryptophan und Aminoacyl-Tryptophan. Die hier aufgeführten fluoreszierenden Verbindungen und deren Anwendungsweise sind im Stand der Technik beschrieben, beispielsweise in Jureus, *Neuropeptides* 32 (1998), 453-460 oder White, *Anal. Biochem.* 268 (1999), 245-251.

Die verwendeten Verbindungen für A, B1-B2, C1-C3 und D der erfindungsgemäßen Peptidderivate können unter Verwendung der dem Fachmann bekannten Modifizierungen weitgehend verändert sein.

Eine wesentliche Eigenschaft der erfindungsgemäßen Peptidderivate ist die Konformation, die im Zusammenhang mit der hier beschriebenen Erfindung als "verspannter Zustand" bezeichnet wird, wobei das Peptidderivat in der Lage ist (nach Lösen der Verbindung zwischen B1 und B2), autonom in den nicht verspannten Zustand überzugehen. Dieser Übergang erfolgt mit einer bestimmten Geschwindigkeit, im folgenden Übergangsgeschwindigkeit genannt. Die Übergangsgeschwindigkeit ist charakteristisch für jedes Peptidderivat und unter gleichen Reaktionsbedingungen auch stets gleich groß.

Im wesentlichen wird die Übergangsgeschwindigkeit durch die Ausführung des Bestandteils C1-C2-C3 innerhalb des erfindungsgemäßen Peptidderivats bestimmt. Bereits atomare Substitutionen an einem oder mehreren dieser Verbindungen können die Übergangsgeschwindigkeit verändern. Die Übergangsgeschwindigkeit ist ein inhärentes Merkmal eines jeden erfindungsgemäßen Peptidderivats.

Die Messung einer Enzymaktivität beruht auf einem der folgenden zwei Effekte, die ein Enzym auf das Peptidderivat ausüben kann:

1. Das zu messende Enzym hat eine Aktivität, die den Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand beschleunigt. Die Beschleunigung kommt entweder dadurch zustande, daß das Enzym die Konformationsänderung katalysiert oder daß das Enzym eine Reaktion katalysiert, die einen erleichterten Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand bewirkt.
2. Das zu messende Enzym hat nicht die unter (1.) genannte Aktivität, sondern greift das nicht verspannte Peptidderivat oder bereits das verspannte Peptidderivat nach Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 an, wobei die katalysierte Reaktion zu einer chemischen Trennung von A und D oder zu einer Trennung des in A oder D enthaltenen Farbstoffs vom restlichen Peptidderivat führt.

Beruht die Messung der Enzymaktivität auf dem unter (1.) beschriebenen Effekt, erfolgt die Detektion dadurch, daß sich das optische Signal durch den Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand des Peptidderivats der Erfindung ändert. Hierbei werden für die Gruppierungen A und D Fluoreszenzfarbstoffe

eingesetzt, bei denen ein Quench-Effekt auftritt. Die Fluoreszenz der Gruppierung A wird im verspannten Zustand des Peptidderivats, vorzugsweise bei geschlossener Bindung von B1 und B2, durch die Gruppierung D gequencht. Dieser Quench-Effekt ist bedingt durch die räumliche Nähe von A und D. Im nicht verspannten Zustand ist die Distanz zwischen A und D größer, was zu einer Herabsetzung des Quench-Effekts und damit einhergehend zu einer Erhöhung der Fluoreszenz von A führt. Allerdings kann auch im nicht verspannten Zustand A durch D partiell gequencht sein. Nach dem Start der Reaktion durch Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 geht bei Abwesenheit eines Enzyms das Peptidderivat von selbst vom verspannten Zustand in den nicht verspannten Zustand über. Dieser Prozeß verläuft nach stochastischen Gesetzmäßigkeiten und erfährt je nach Struktur des Peptidderivatmoleküls nach einer bestimmten Zeit eine Sättigung. Diese Sättigungskinetik läßt sich durch kontinuierliche Messung der Fluoreszenzzunahme in einer Sättigungskurve darstellen, in der absolute oder relative Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen ist (siehe Fig. 1).

In einem Reaktionsansatz, der ein Enzym enthält, das die Übergangsreaktion beschleunigt, sonst aber zu dem Ansatz ohne Enzym identisch ist, erfolgt der Übergang vom verspannten zum nicht verspannten Zustand mit einer größeren Geschwindigkeit. Dies wirkt sich auf die Kinetik dahingehend aus, daß der Anstieg steiler ausfällt und die Sättigung früher erreicht wird. Enzyme, die den Übergang des Peptidderivats vom verspannten in den nicht verspannten Zustand katalysieren bzw. eine Reaktion katalysieren, die den Übergang erleichtert, sind im Sinne der Erfindung vorzugsweise Isomerasen, besonders bevorzugt Peptidyl-Isomerasen. Ferner kann der Einfluß von Inhibitoren oder Aktivatoren auf solche Enzyme in Reaktionsansätzen nach (1.) bestimmt werden. Bei der Messung von Inhibitoren eines eingesetzten Enzyms wird eine langsamere Geschwindigkeit der Fluoreszenzzunahme auf das Sättigungsniveau beobachtet. Im Gegensatz dazu steigt bei der Messung von Aktivatoren dieser Enzyme die beobachtete Reaktionskurve schneller auf das Sättigungsniveau.

Wie bereits oben erwähnt hängt die Übergangsgeschwindigkeit im wesentlichen von den chemischen Eigenschaften des Bestandteils C1-C2-C3 des Peptidderivats ab. Zusätzlich nehmen die Reaktionsbedingungen, darunter besonders die Temperatur, Einfluß auf die Übergangsgeschwindigkeit. Für Aktivitätsmessungen nach dem unter

(1.) definierten Aspekt sollte die peptidderivatspezifische Übergangsgeschwindigkeit (ohne Enzym) relativ klein sein, um einen günstigen Meßbereich zu erhalten. Wenn diese Grundübergangsgeschwindigkeit zu groß ist, fällt der Unterschied der Übergangsgeschwindigkeiten zwischen der Messung mit und der ohne Enzym weniger signifikant aus. Dadurch wird der Meßbereich etwa zur Erfassung des Einflusses von Inhibitoren kleiner. Bevorzugt sollte die katalysierte Übergangsgeschwindigkeit mindestens doppelt so hoch sein, wie die nicht katalysierte Reaktion.

Neben Enzymen, die wie oben beschrieben den Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand beschleunigen können, wie unter (2.) aufgeführt auch andere Enzyme mit Hilfe des erfindungsgemäßen Peptidderivats untersucht werden. Dies hat zur Voraussetzung, daß die Enzyme eine Reaktion katalysieren, die zu einer chemischen Trennung von A und D oder zu einer Trennung des in A oder D enthaltenen Farbstoffs vom restlichen Peptidderivat führt.

Bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen für A und D, die einen Quench-Effekt ausüben, lassen sich drei Stufen der zu messenden Fluoreszenz unterscheiden:

- (i) Ausgangszustand im verspannten Peptidderivat, bei dem A maximal von D gequencht wird;
- (ii) Fluoreszenz von A, wenn das Peptidderivat im nicht verspannten Zustand vorliegt und A partiell von D gequencht wird; und
- (iii) maximale Fluoreszenz von A, wenn durch eine Spaltung innerhalb des Peptidderivats A und D bzw. die darin enthaltenen Farbstoffe getrennt sind und D keinen Quench-Effekt auf A ausübt.

Bei der Aktivitätsmessung wird einerseits das Fluoreszenzverhalten des Peptidderivats in der Reaktionslösung ohne Enzym gemessen. Dabei nähert sich die Fluoreszenz ausgehend von (i) dem Niveau (ii) an. Andererseits steigt die Fluoreszenz bei der Messung mit Enzym ausgehend von (i) auf das Niveau (iii). Der meßbare Fluoreszenzunterschied zwischen (ii) und (iii) wird hierbei zur Bestimmung enzymatischer Reaktionen benutzt. Dies betrifft vorzugsweise Enzyme, die eine kovalente Bindung zwischen A und D bzw. innerhalb einer Gruppierung A oder D spalten, wie beispielsweise Proteasen. Bei der Messung der enzymkatalysierten Reaktion (i) bzw. (ii) nach (iii) (je nachdem, ob das Enzym nach der Lösung der B₁-

B₂-Bindung bereits das verspannte Substrat (i) oder erst das nicht verspannte Substrat (ii) angreift) wird bei der Messung von Inhibitoren eines eingesetzten Enzyms eine langsamere Geschwindigkeit der Fluoreszenzzunahme auf das Niveau (iii) beobachtet. Im Gegensatz dazu steigt bei der Messung von Aktivatoren dieser Enzyme die beobachtete Reaktionskurve schneller und geht ebenfalls gegen das Niveau (iii).

Bei Aktivitätsmessungen, insbesondere nach (2.), kann aus praktischen Gründen die Übergangsgeschwindigkeit allgemein durch den Zusatz eines Enzyms, wie beispielsweise einer Peptidyl-Prolyl-Isomerase, in den zu vergleichenden Ansätzen erhöht werden. Diese Erhöhung betrifft den Übergang von Niveau (i) zu (ii).

Somit betrifft eine besondere Ausführungsform der Erfindung Peptidderivate, wobei sich das optische Signal, das von A und D ausgeht, sich zusätzlich zum verspannten und nicht verspannten Zustand des Peptidderivats von dem Zustand unterscheidet, der vorliegt, wenn die chemische Verbindung zwischen A und D oder zwischen einem in A oder D enthaltenen Farbstoff und dem restlichen Peptidderivat durch enzymatische Katalyse getrennt wurde.

Zu Aktivitätsmessungen nach (2.), bei denen im wesentlichen der Fluoreszenzunterschied zwischen dem nicht verspannten Zustand und dem Zustand, bei dem A und D bzw. ein in A oder D enthaltener Farbstoff und das restliche Peptidderivat chemisch getrennt vorliegen, gemessen wird, sind relativ hohe Grundübergangsgeschwindigkeiten (für das Peptidderivat ohne Enzym) von Vorteil. Dies gilt insbesondere für den Fall, daß das Enzym nach der Lösung der Bindung zwischen B₁ und B₂ das Peptidderivat sowohl im verspannten als auch im nicht verspannten Zustand als Substrat verwertet. Wenn die Übergangsgeschwindigkeit groß ist gegenüber der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit, geht der Großteil der Peptidderivate zuerst in den nicht verspannten Zustand über und wird im zweiten Schritt durch das Enzym katalysiert. Dadurch ist die Enzymkinetik an die Grundübergangskinetik gebunden und die beiden Kinetiken (Reaktion mit und ohne Enzym) lassen sich gut vergleichen. Wenn dagegen die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms groß ist gegenüber der Grundübergangsgeschwindigkeit, ist die Enzymkinetik unabhängig von der Übergangskinetik, weil ein Großteil der eingesetzten Peptidderivatmoleküle direkt vom verspannten Zustand in den Zustand

der Trennung von A und D bzw. der Trennung eines in A oder D enthaltenen Farbstoffs vom restlichen Peptidderivat, d.h. der maximalen Fluoreszenz, gelangt. Günstige Unterschiede der Übergangsgeschwindigkeiten ausgedrückt als Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k liegen zwischen den Reaktionen nach (1) (k_{i-ii}) und (2) (k_{ii-iii}) dann vor, wenn k_{ii-iii} mindestens doppelt so groß ist wie k_{i-ii} . Diese Forderung läßt sich durch Zusatz von Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerasen zum Reaktions-Ansatz leicht erfüllen, da diese Enzyme nur Reaktionen nach (1) katalysieren. Für den Fall, daß nur der nicht verspannte Zustand ein verwertbares Substrat für das zu untersuchende Enzym darstellt, gilt wieder das für den Fall (1.) gesagte. Die Kinetik der enzymkatalysierten Reaktion hängt ab von der Grundübergangskinetik, da die enzymatische Reaktion von der Bereitstellung des nicht verspannten Peptidderivats abhängig ist. Wenn die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit groß ist gegenüber der Grundübergangsgeschwindigkeit, dann wird der Großteil des entstehenden nicht verspannten Peptidderivats schnell enzymatisch umgesetzt. Dadurch wird ein maximaler Unterschied zwischen den Fluoreszenzkinetiken mit und ohne Enzym erreicht. Dies hat zur Folge, daß ein maximaler Meßbereich für die Messung des Einflusses von zugesetzten Inhibitoren zur Verfügung steht. Bei einer enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit, die relativ klein ist gegenüber der Grundübergangsgeschwindigkeit (ohne Enzym), wird zunächst nur ein kleiner Teil des nicht verspannten Peptidderivats enzymatisch umgesetzt und die Sättigung der Produkte, bei denen A und D bzw. die darin enthaltenen Farbstoffe getrennt vorliegen, erst lange nach der Sättigung des Übergangs vom verspannten in den nicht verspannten Zustand erreicht. Bei Aktivitätsmessungen, die nach dem unter (2.) aufgeführten Effekt ablaufen, können auch Farbreaktionen, also mit dem menschlichen Auge wahrnehmbare Unterschiede der optischen Eigenschaften der Reaktionslösung, verwendet werden. A und/oder D enthalten in dem Fall Farbstoffe, die beispielsweise durch proteolytische Abspaltung vom Peptidderivat ihre optischen Eigenschaften verändern.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Peptidderivate sind die Aktivitäten sämtlicher Enzyme meßbar, für die die Peptidderivate ein Substrat darstellen, solange diese Aktivitäten einen Einfluß haben auf die oben beschriebenen Änderungen des optischen Signals und gleichzeitig diese Aktivität durch die geschlossene Bindung

zwischen B1 und B2, vorzugsweise auch durch den verspannten Zustand des Peptidderivats, blockiert ist.

Vorzugsweise betrifft dies Enzyme, deren Aktivität substratspezifisch ist für Peptidstrukturen. Darunter fallen besonders bevorzugt Aktivitäten, die auf Peptidbindungen gerichtet sind. Ebenso bevorzugt sind alle anderen Bindungen, die in einem Peptid (oder Peptidderivat) vorhanden sein können, beispielsweise innerhalb der Seitenkette einer oder mehrerer Aminosäuren oder Bindungen, die Substituenten mit Aminosäuren verbinden oder innerhalb solche Substituenten liegen. Allerdings können mit den Peptidderivaten im Rahmen der Erfindung auch Enzyme untersucht werden, die für andere Molekülklassen spezifisch sind, beispielsweise für Nucleotide, Oligonucleotide, Lipide, Kohlehydrate oder andere organische Moleküle. Hierzu können gemäß der Ausführungsform des Peptidderivats für C1, C2 und/oder C3 entsprechende Substrate in das Peptidderivat eingebaut werden. Beispielsweise ist es möglich, für C1, C2 oder C3 Verbindungen einzusetzen, die phosphorylierbar/dephosphorylierbar sind. So konnte im Rahmen der vorliegenden Erfindung mit je einem Vertreter einer Kinase und einer Phosphatase gezeigt werden, daß nur die unverspannte Form eines derart ausgeführten, erfindungsgemäßen Peptidderivats phosphorylierbar bzw. dephosphorylierbar ist.

Vorzugsweise lassen sich peptidspezifische Enzyme mit Hilfe des Peptidderivats untersuchen, besonders bevorzugt Proteasen, Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerasen, Kinasen, Phosphatasen, Glykosidasen oder Lipasen/Esterasen. Insbesondere bevorzugt sind davon Proteasen und Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerasen.

Einer der wesentlichen Vorzüge gegenüber den im Stand der Technik beschriebenen Substraten und deren Verwendung in Enzymtests ist die besondere Eigenschaft des erfindungsgemäßen Peptidderivats, daß der Start der Enzymreaktion durch ein exogenes Signal induziert werden kann. Wie oben beschrieben, führt dieses physikalische oder chemische Signal zur Lösung der Bindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat. Dies ermöglicht die Mischung aller für die Enzymreaktion notwendigen Komponenten, einschließlich des Enzyms, des Substrats und gegebenenfalls eines zu untersuchenden Effektors, ohne daß die enzymatische Reaktion in Gang kommt.

Eine Gemeinsamkeit unterschiedlichster Enzym-Assays ist die Notwendigkeit der Schaffung einer homogenen Mischung, die zumindest aus Substrat und Enzym besteht. Die Schaffung einer homogenen Mischung ist eine wesentliche Vorbedingung, um enzymatische Aktivitätsbestimmungen reproduzierbar durchführen zu können. Üblicherweise werden enzymatische Reaktionen, die beispielsweise zur Beurteilung von Enzym-Effektoren dienen sollen, durch Zugabe des Substrates zu einer Mischung aus Enzym und zugesetztem Effektor gestartet. Diese Verfahrensweise hat den Vorteil, daß langsam wirkende Effektoren, die dem Fachmann beispielsweise als „Slow Binding“-Inhibitoren bekannt sind, ihre Wirkung auf das Enzym entfalten können. Um durch Zugabe des Substrates die Konzentrationen der in der Mischung vorhandenen Stoffe, wie Enzym und Effektor nicht wesentlich zu ändern, tragen die zugesetzten Volumina des Substrates nur wenig zum resultierenden Gesamtvolumen der Reaktionslösung bei. Das Problem besteht oft darin, das in einem geringen Volumen gelöste Substrat in möglichst kurzer Zeit homogen mit dem Vorinkubationsansatz zu vermischen. Dies gelingt naturgemäß nur dann in gewünschter Weise, wenn die Löslichkeit des Substrates im resultierenden Endvolumen relativ hoch ist. Substrate, deren Konzentration sich im Endvolumen nahe ihrem Löslichkeitsprodukt befinden, lassen sich nur schlecht innerhalb kurzer Zeit homogen lösen. Aus diesem Grund sind solche Enzymsubstrate bisher denkbar ungeeignet für die Nutzung in Routine-Assays zum Nachweis enzymatischer Reaktionen.

Im Stand der Technik wurden beispielsweise zum Nachweis der Aktivität von Proteasen bereits einige Methoden beschrieben, die der Forderung nach einem Substrat, welches eine Aktivitätsmessung mit großer Signaldirektheit und Signalkontinuität gemäß der vorliegenden Patentanmeldung ermöglichen, sehr nahe kommen. So wurden z.B. Substrate beschrieben, die so aufgebaut sind, daß durch die direkte Wirkung der Protease auf das Substrat ein Farbstoff freigesetzt wird. Da die Farbänderung der proteolytischen Reaktion direkt proportional ist, wird diese Änderung als Aktivitätsmaß der Protease benutzt. Bei der Untersuchung der Wirkung von Effektoren auf die Katalyse der proteolytischen Reaktion wird zumeist die Protease für einige Zeit, der Vorinkubationszeit, mit dem Effektor vorinkubiert. Dadurch wird es dem Gemisch aus Effektor und Enzym ermöglicht, entsprechend ihrer chemischen Gegebenheiten miteinander zu interagieren. Zwangsläufig muß

nun die eigentliche Reaktion, welche zur Aktivitätsbestimmung genutzt wird, durch Zugabe des Substrates zum Effektor/Enzym-Gemisch gestartet werden. Dies ist nur dann erfolgreich, wenn es gelingt, das Substrat innerhalb kurzer Zeit mit dem Effektor/Enzym-Gemisch homogen zu vermischen. Unglücklicherweise sind zahlreiche Peptidsubstrate bekannt, die eine nur schlechte Wasserlöslichkeit aufweisen. Solche Substrate werden üblicherweise in geeigneten Lösungsmitteln, wie z.B. DMSO, in hohen Konzentrationen gelöst, um sie dann zusammen mit diesem Lösungsmittel dem Effektor/Enzym-Gemisch beizumischen.

Hier besteht das Problem darin, daß sich das gewünschte Peptidsubstrat zwar in dem Endvolumen des Reaktionsansatzes lösen würde, aber bedingt durch lokale Inhomogenitäten zumeist ausfällt und erst später wieder in Lösung geht. Die Verlängerung der Mischzeit durch solche Prozesse kann eine Aktivitätsbestimmung mit schwer löslichen Substraten unmöglich machen.

Die Problematik der Schaffung einer homogenen Mischung im Ansatz des Enzym-Assays ist durch die Bereitstellung des erfindungsgemäßen Substrats gelöst. Die zur Bestimmung der Enzymaktivität notwendigen Reagenzien, wie Enzym und Substrat oder wünschenswerte Zusätze wie beispielsweise zu untersuchende Effektoren lassen sich vor dem Start der eigentlichen Reaktion über eine beliebig lange Zeit miteinander inkubieren, da das eigentliche Substrat erst durch Lösen der Bindung von B1 und B2 im erfindungsgemäßen Peptidderivat bereitgestellt wird. Das Peptidderivat kann bei geschlossener B1-B2-Bindung in solchen Konzentrationen eingesetzt werden, die der maximalen Löslichkeit des Substrates unter den gewählten Testbedingungen sehr nahe kommen.

Das Lösen der B1-B2-Bindung wird entweder durch Zugabe eines geringen Volumens einer geeigneten Chemikalie oder ohne Volumenveränderung mittels Lichtblitz ausgelöst. Dadurch wird beim Start der Reaktion auch bei schwer löslichen Substraten die Konzentrationen von Vorinkubationsansatz und eigentlichem Meßansatz kaum oder überhaupt nicht verändert. Im Sinne der Erfindung muß allerdings gewährleistet sein, daß das Startsignal effektiv und gleichzeitig die Peptidderivate in einer homogenen Mischung erreicht, da sich sonst ein neues Inhomogenitätsproblem ergeben würde. Dies sollte bei der Nutzung eines physikalischen Signals wie beispielsweise einem Lichtblitz bei entsprechender Ausgestaltung der experimentellen Apparatur gegeben sein. Bei Verwendung einer

Starterchemikalie ist zu beachten, daß sie in dem gegebenen Reaktionsgemisch leicht löslich ist. Generell sind für diesen Zweck bevorzugt niedermolekulare Verbindungen zu verwenden, wie etwa das in den Beispielen 1 bis 3 verwendete DTT.

Die Peptidderivate der vorliegenden Erfindung stellen Substrate für enzymatische Reaktionen dar, die mit größtmöglicher Signaldirektheit detektiert werden können. Signaldirektheit ist ein wichtiges Kriterium für die Güte eines Enzymtests. Für einige Enzyme existieren keine geeigneten Substrate, mit denen sich der Substratproduktumsatz zuverlässig direkt messen läßt. In einigen Fällen existieren zwar Techniken, die eine direkte Messung der Substratproduktumsätze erlauben, jedoch sind diese oft apparativ aufwendig oder nur unter idealen Bedingungen anwendbar, so daß sie sich nicht zum routinemäßigen Einsatz, beispielsweise in Massensuchtests eignen. Um solchen Begrenzungen zu entgehen, mußte man sich bisher mit Hilfsreaktionen behelfen, mit denen die Produktmenge mit Hilfe einer zusätzlichen enzymatischen Reaktion in detektierbaren Signalstärken abgebildet wird. Solche Hilfsreaktionen laufen synchron zur Primärreaktion und in demselben Reaktionsansatz wie diese ab. Der entscheidende Nachteil solcher Hilfsreaktionen ist die geringere Signaldirektheit, die eine Zunahme potentieller, störender Einflußfaktoren zur Folge hat. Dies gilt beispielsweise für die Aktivitätsmessung von Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerasen (PPlasen), die durch eine als Hilfsreaktion angekoppelte isomerspezifische Proteolyse detektierbar ist (Fischer, Biochim. Biophys. Acta 43 (1984), 1101; Fischer, Nature 337 (1989), 476).

Zum einen können Einflußfaktoren, die auf die angekoppelte Reaktion oder ihre Bestandteile wirken, die Interpretation der Meßsignale erschweren oder unmöglich machen. Im Beispiel der PPlase-Katalyse mittels angekoppelter isomerspezifischer Proteolyse würde es der inhibitorische Einfluß von Effektoren auf die enzymatische Aktivität der verwendeten Hilfsprotease erschweren oder unmöglich machen, eine Wirkung dieses Proteasehemmstoffes auf die PPlase-Katalyse zu erkennen. Damit würde bei Verwendung eines solchen gekoppelten Testes im Rahmen eines Suchtestes nach Wirkstoffen, die die PPlase-Aktivität effektuieren, alle die Substanzen nicht getestet werden können, die die Hilfsprotease unerwünscht inhibieren. Ein weiterer Nachteil einer zu geringen Signaldirektheit kann auch die

Wirkung der für die angekoppelte Reaktion notwendigen Bestandteile auf die Primärreaktion selbst oder auf andere zu detektierende Bestandteile sein. So kann die in diesem Beispiel notwendige Hilfsprotease eine nachteilige Wirkung auf die Aktivität der zu detektierenden PPlase haben. Auch ließen sich aufzufindende PPlase-Effektoren, die nicht proteasestabil sind, nicht detektieren.

Dank der vorliegenden Erfindung ist es nun möglich, die Aktivität von Enzymen, für die bislang keine geeigneten Substrate vorlagen, wie z.B. PPlasen, mit größtmöglicher Signaldirektheit zu messen, wie es in Beispiel 1 dargestellt ist.

Für die Aktivitätsmessung von PPlasen waren allerdings zuletzt schon andere Verfahren beschrieben worden, die ohne Hilfsreaktionen auskommen. Ein Verfahren, das der Erfindung besonders nahe kommt, nutzt die geringen isomerspezifischen spektroskopischen Unterschiede geeigneter PPlase-Substrate aus (Janowski, *Analytical Biochemistry* 252 (1997), 299; Garcia-Echeverria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191 (1993); Garcia-Echeverria, *Am. Chem. Soc.* 114 (1992), 2758). Allerdings sind diese Unterschiede so gering, daß diese Methode sehr hochwertige spektroskopische Detektoren benötigt. Ein weiterer Nachteil dieser geringen spektroskopischen Unterschiede liegt in der Beschränkung auf Aktivitätsmessungen unter idealen Bedingungen, bei denen geringe spektroskopische Störungen, wie sie bei Aktivitätsmessungen in realen biologischen Flüssigkeiten unvermeidlich sind, nicht auftreten.

Ein zusätzlicher Nachteil dieser Methode liegt in der Art der Bereitstellung des Substrates. Um isomerspezifische spektroskopische Unterschiede detektieren zu können, muß das Ausgangssubstrat in einer nur schwer handhabbaren Lösung aus Lithiumchlorid und Trifluorethanol gelöst werden. Die enzymatische Reaktion wird dann durch Zugabe dieser Substratlösung zum Reaktionsansatz gestartet. Damit ist dieses Verfahren unvorteilhaft für die Verwendung im Rahmen eines Massensuchtests.

Demgegenüber können erfindungsgemäße PPlase-Substrate wie in Beispiel 1 beschrieben, lange Zeit in leicht handhabbaren Lösungsmitteln wie wäßrigen Puffern, oder geeigneten organischen Lösungsmitteln wie DMSO oder Ethanol aufbewahrt und im Assay eingesetzt werden. Ihre Zugabe zum Reaktionsansatz kann lange vorher erfolgen. Der Start der eigentlichen PPlase-Reaktion erfolgt erst, bei Verwendung einer photosensible Verspannung durch einen Lichtblitz, oder bei

Verwendung anderer Funktionalitäten durch Zugabe einer geeigneten Chemikalie, die die Verspannung aufheben, wie dies in Beispiel 1 beschrieben wird.

Neben den oben diskutierten Kriterien der homogenen Mischung und der Signaldirektheit ist als drittes Kriterium die Signalkontinuität als Qualitätsmerkmal für Aktivitätsmessungen von Enzymen zu nennen. Während es bei einigen Substraten, wie oben für Protease-Assays beschrieben, relativ leicht ist, kontinuierlich während der enzymatischen Reaktion Meßwerte zu erhalten, beispielsweise durch Messung eines proteolytisch freigesetzten Farbstoffs, ist dies für zahlreiche Enzyme und ihre Substrate nur unzureichend möglich. Um trotzdem das zur Beschreibung der enzymatischen Reaktion notwendige Datenmaterial zu erhalten, wurden bisher diskontinuierliche Verfahren angewendet.

Das Gemeinsame dieser diskontinuierlichen Verfahren ist, daß die eigentlich zu bewertende kontinuierlich ablaufende enzymatische Reaktion zeitlich und räumlich unabhängig von einer zweiten Reaktion abläuft, die die Detektion des Substratumsatzes ermöglicht.

So wurden beispielsweise zum Nachweis der Aktivität von Proteinphosphatasen unterschiedlichste Assays beschrieben, bei denen während der Phosphatasereaktion fortlaufend Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen werden, um diese Aliquots nachfolgend mittels eines zweiten Assays detektieren zu können (Cohen, *Methods in Enzymology* 201 (1991), 389-391; Pinna, *Biochim. Biophys. Acta* 1222 (1994), 415-431; Ruzzene, *Eur. J. Biochem.* 211 (1993), 289-295; Harder, *Biochem. J.* 298 (1994), 395-401). Diesen Phosphataseaktivitätsverfahren ist gemeinsam, daß das durch die Proteinphosphatase freigesetzte Phosphat in diesem zweiten Assay bestimmt wird.

So kann z.B. mittels geeigneter Phosphatasesubstrate, wie z.B. mittels der Sequenz Abz-Cys-Ala-Ser(phosphoryliert)-Pro-Cys-NHNp (SEQ ID NO:1), die Aktivität einer Proteinphosphatase wie PP2a kontinuierlich bestimmt werden. In diesem besonderen Fall wird ausgenutzt, daß eine als Hilfsenzym zugesetzte Protease nur die nicht-phosphorylierte Form des Substrates proteolytisch spalten kann. Eine zeitabhängige Fluoreszenzzunahme ist dann in diesem Ansatz proportional der Phosphataseaktivität.

Ähnliche diskontinuierliche Verfahren sind für Proteinkinasen beschrieben (Pin, *Analytical Biochemistry* 275(2) (1999), 156-161; Seya, *Analytical Biochemistry* 272(2)

(1999), 243-249; Peterson, Analytical Biochemistry 271(2) (1999), 131-136). Der gravierendste Nachteil dieser diskontinuierlichen Verfahren ist neben den oben diskutierten Fehlermöglichkeiten beim Arbeiten mit Hilfsreaktionen, in dem im Vergleich zu kontinuierlichen Verfahren größeren Material- und zeitlichen Aufwand zu sehen, der notwendig ist, um eine solche Signalmenge zu bekommen, mit deren Hilfe es möglich ist, die enzymatische Reaktion zu beschreiben.

Mit Hilfe des durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten Peptidderivats ist es nun möglich, die Aktivität vieler Enzyme, die bislang nur mit Hilfe von diskontinuierlichen Detektionsmethoden zu erfassen waren, kontinuierlich zu messen. Dies gilt im Besonderen für Proteinphosphatasen und Proteinkinasen.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft Peptidderivate, die dadurch charakterisiert sind, daß der verspannte Zustand die cis-Konformation an mindestens einer chemischen Bindung innerhalb der Verbindungen C1 bis C3 ist und der nicht verspannte Zustand die trans-Konformation an der Bindung ist.

Cis- und trans-Konformationen sind dem Fachmann geläufig. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bedeutet "cis" und "trans" unterschiedliche Bindungswinkel einer Peptidbindung, wie sie z.B. in Fischer (Ang. Chemie 106 (1994), 1479-1501) beschrieben sind.

Die in den erfindungsgemäßen Peptidderivaten enthaltenen cis-Konformationen gehen nach Öffnung der B1-B2-Bindung von selbst in die trans-Konformation über. Die cis/trans-Isomerie betrifft im Rahmen dieser Ausführungsform der erfindungsgemäßen Peptidderivate alle chemischen Bindungen, für die cis/trans-Konformationen definiert werden können. Desweiteren sind die Peptidderivate dieser Ausführungsform in der Lage, eine Konformationsänderung im Sinne der Erfindung, d.h. den Übergang von einem verspannten in einen nicht verspannten Zustand, auszuführen. Vorzugsweise liegt die Bindung, die die cis/trans-Isomerie verursacht, innerhalb des Bestandteils C1-C2-C3 des Peptidderivats, genauer gesagt, zwischen den Verbindungen C1 und C2 oder C2 und C3 oder innerhalb einer dieser Verbindungen. Besonders bevorzugt betrifft eine solche cis/trans-Isomerie eine Bindung, die im Peptidrückrat des erfindungsgemäßen Peptidderivats liegt, insbesondere bevorzugt eine Peptidbindung. Der Ausdruck „trans-Konformation“ umfaßt in der vorliegenden Ausführungsform auch die Möglichkeit, daß sich nach

Ablauf der Reaktion, beispielsweise wenn sich ein Gleichgewichtszustand einstellt, ein Bruchteil der eingesetzten Peptidderivate in der cis-Konformation befindet.

Die in den Beispielen 1 bis 3 verwendeten Peptidderivate entsprechen dieser Ausführungsform. Wie aus den Beispielen weiterhin hervorgeht, lassen sich Peptidderivate, bei denen der Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand auf einer cis/trans-Isomerie beruht, für beide Anwendungsbereiche der vorliegenden Erfindung einsetzen, d.h. sowohl für

1. Aktivitätsmessungen von Enzymen, die den Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand, d.h. in dem Fall von der cis- in die trans-Konformation katalysieren (wie in Beispiel 1); als auch für
2. Aktivitätsmessungen von Enzymen, die eine chemische Trennung der in A und D enthaltenen Farbstoffe herbeiführen (wie in Beispiel 2).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Peptidderivats ist die Bindung, die eine cis/trans-Isomerie verursacht, eine Peptidbindung zwischen der Aminogruppe eines Prolinrests oder eines Derivats davon und der Carboxygruppe der benachbarten Aminosäure.

Die Peptidbindung ist eine partielle Doppelbindung zwischen dem Kohlenstoff der Carboxygruppe der ersten Aminosäure und dem Stickstoffatom der Aminogruppe der nachfolgenden Aminosäure (Stryer, Biochemie, deutsche Übersetzung, 1990, Seite 25). Normalerweise ist bei einer Peptidbindung das Sauerstoffatom der Carboxygruppe und das Wasserstoffatom der Aminogruppe gegenständig, also in trans angeordnet. Dagegen kann die Peptidbindung, bei der die Aminogruppe bzw. Iminogruppe von einem Prolinrest beigesteuert wird, in natürlich vorkommenden Proteinen und Peptiden in der cis-Konformation vorkommen. In Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz stellt sich, in erfindungsgemäßen Peptidderivaten, in denen für C1 bis C3 mindestens ein Prolin oder ein Derivat davon enthalten ist, in wäßrigen Lösungen in unverspanntem Zustand eine Mischung ein, die zu etwa 5-35% Peptide enthält, die eine cis-Prolylpeptidbindung aufweisen. In den verspannten Peptiden kann dieser Anteil bis zu 100% betragen. Eine gute Übersicht findet sich unter Fischer, Ang. Chemie 106 (1994), 1479-1501 und Reimer et al., J. Mol. Biol. 279 (1998), 449.

Unter "Prolinrest oder Derivat davon" ist im Rahmen dieser Ausführungsform ein natürliches proteinogenes L-Prolin, ein D-Prolin sowie alle möglichen dem Fachmann zugänglichen Modifikationen der Aminosäure zu verstehen, solange das C-N-Grundgerüst des Prolinrests erhalten bleibt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung zusätzlich Peptidderivate, die auch im verspannten Zustand für eine zu testende Enzymaktivität ein Substrat darstellen.

Zusätzlich zu den bis hierhin beschriebenen Ausführungsformen der Erfindung, in denen stets nur das nicht verspannte Peptidderivat oder zumindest das Peptidderivat mit gelöster B1-B2-Bindung das funktionale Substrat für die Messung einer Enzymaktivität darstellt, stellen die Peptidderivate dieser Ausführungsform der Erfindung auch im verspannten Zustand, der durch geschlossene B1-B2-Bindung stabilisiert wird, ein Substrat dar.

Wie in Beispiel 3 beschrieben, lassen sich mit derartigen Peptidderivaten Enzyme selektionieren, deren Aktivität beispielsweise darin besteht, die B1-B2-Bindung zu lösen oder A oder D oder in A und/oder D enthaltene Farbstoffe vom Peptidderivat zu trennen.

Allerdings kommt in dieser Ausführungsform der Erfindung ein besonderer Vorteil der vorgenannten Ausführungsformen nicht zum Tragen, d.h. im wesentlichen, daß der Start der enzymatischen Katalyse nicht von außen induziert werden kann. Das bedeutet, daß bei dieser Ausführungsform der Peptidderivate die Reaktion, wie in vielen mit Nachteilen behafteten Verfahren aus dem Stand der Technik durch Vermischen der notwendigen Komponenten gestartet wird. Allerdings lassen sich mit Hilfe von Peptidderivaten dieser Ausführungsform neue Enzyme isolieren, deren Aktivität noch nicht bekannt war.

Ferner betrifft die Erfindung ein Kit, umfassend das Peptidderivat nach einer der oben gekennzeichneten Ausführungsformen, eine Vorrichtung oder ein Reagens zum Lösen der Verbindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat, eine oder mehrere Pufferlösungen und/oder ein oder mehrere Enzyme, für die das Peptidderivat ein Substrat darstellt.

Aus praktischen Gründen und zum Zwecke der einfachen Anwendbarkeit und Vermarktung läßt sich das erfindungsgemäße Peptidderivat zusammen mit für die Anwendung in Enzym-Assays benötigten Komponenten, oder einer Teilauswahl davon, in Kits zusammenfassen. Je nach vorgesehener Anwendung umfaßt das Kit eine oder mehrere Peptidderivate der vorliegenden Erfindung, wobei die Peptidderivate für eine oder mehrere Enzymaktivitäten ein Substrat darstellen. In einer bevorzugten Ausführungsform des Kits liegen die darin enthaltenen Peptidderivate in der durch die geschlossene Bindung zwischen B1 und B2 stabilisierten verspannten Form vor. Je nach Löslichkeit des oder der Peptidderivate sind für die Lagerung geeignete Lösungsmittel zu wählen, wie beispielsweise DMSO, Ethanol, etc. Als eine weitere Komponente kann ein solches Kit eine Vorrichtung oder ein Reagens zum Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 enthalten. Handelt es sich bei dem oder den im Kit enthaltenen Peptidderivate(n) um Ausführungen mit einer photosensiblen Bindung zwischen B1 und B2, so sollte das Kit beispielsweise eine Vorrichtung zur zuverlässigen Erzeugung eines Lichtblitzes enthalten, der in der Lage ist, die B1-B2-Bindung zu lösen. Falls die B1-B2-Bindung durch chemischen Einfluß geschlossen ist, so kann das Kit ein entsprechendes Reagens zum Öffnen enthalten. Bei einer Disulfid-Brückenbindung zwischen B1 und B2 ist eine reduzierende Verbindung auszuwählen wie z.B. DTT, vorzugsweise in einer direkt einsetzbaren Konzentration, wie z.B. 250 mM DTT in 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5. Desweiteren kann das Kit bereits Enzyme umfassen, für die die enthaltenen Peptidderivate Substrate darstellen. Die Enzyme können beispielsweise Standards darstellen mit definierten Aktivitätseinheiten zum quantitativen Vergleich in Enzym-Assays. Andererseits können derart in dem Kit enthaltene Enzyme für Assays zur Ermittlung der Aktivität bestimmter Effektoren eingesetzt werden. Desweiteren können neben dem/den Enzym(en) auch Effektorverbindungen enthalten sein mit definierter inhibitorischer oder aktivierender Aktivität, die als Standard für zu testende Effektoren dienen können.

Zusätzlich kann ein erfindungsgemäßes Kit weitere Komponenten enthalten, die dem Anwender für die Verwendung der Peptidderivate in Enzym-Assays hilfreich sein kann, wie z.B. Pufferlösungen oder Stammlösungen davon für Reaktionslösungen, zur Lagerung, zur Verdünnung oder Modifizierung einer oder mehrerer Komponenten des Kits. Falls das Kit beispielsweise Enzyme enthält, deren Aktivität

abhängig von Cofaktoren ist, so können diese ebenfalls in dem Kit enthalten sein. Da es sich um biochemische Verbindungen/Moleküle handelt, die in dem Kit enthalten sind, empfiehlt sich eine Verpackung für das Kit, die eine Kühlung zuläßt. Weiterhin sollte bei der Verpackung des Kits auf Lichtundurchlässigkeit geachtet werden, zumindest für die Peptidderivate, die Farbstoffe enthalten.

Desweiteren umfaßt die Ausführungsform alle Kits, die neben dem erfindungsgemäßen Peptidderivaten zusätzlich zu den oder an Stelle der sonstigen hier genannten Komponenten andere oder weitere Komponenten enthalten, die dem Fachmann zu einer bestimmten Anwendung des Peptidderivats notwendig oder nützlich erscheinen.

Eine besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft Verfahren zur Bestimmung der Aktivität eines Enzyms, für das die erfindungsgemäßen Peptidderivate oder Teile davon ein Substrat darstellen, wobei vorzugsweise die Peptidderivate bei geschlossener Bindung zwischen B1 und B2 kein oder zumindest ein schlechtes Substrat darstellen, bestehend aus den Schritten

- (a) Mischen einer geeigneten Menge des Peptidderivats in jeweils einer für die Aktivität des Enzyms geeigneten Reaktionslösung mit und ohne dem Enzym;
- (b) Starten der Reaktion durch Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat;
- (c) Messen des optischen Signals in Abhängigkeit von der Zeit; und
- (d) Bestimmen der Aktivität des Enzyms durch Bestimmen der Differenz der Geschwindigkeiten der Änderung des optischen Signals in den Reaktionslösungen mit und ohne dem Enzym.

Für das Verfahren dieser Ausführungsform der Erfindung werden die erfindungsgemäßen Peptidderivate verwendet, für die das zu untersuchende Enzym der verspannte Zustand, zumindest aber das Peptidderivat mit geschlossener B1-B2-Bindung kein oder zumindest ein schlechtes Substrat darstellt. Der Ausdruck „kein Substrat“ bedeutet dabei in diesem Zusammenhang, daß bei geschlossener Bindung zwischen B1 und B2 keine Farbänderung beobachtbar ist. Dies schließt jedoch nicht aus, daß die Peptidderivate nicht zumindest in geringem Maße als Substrat dienen, was aber nicht beobachtbar ist, da die möglichen Konformationen im Gleichgewicht stehen. Vorzugsweise sind für dieses Verfahren Peptidderivate

ausgeschlossen, die in einer der vorgenannten Ausführungsformen der Erfindung auch im verspannten Zustand bzw. bei geschlossener B1-B2-Bindung ein Substrat für ein Enzym darstellen. Enzyme, die mit diesem Verfahren untersucht werden können, sind bereits oben definiert worden als Enzyme, deren Aktivität mit Hilfe des für dieses Verfahren vorgesehenen Peptidderivats der Erfindung meßbar sind.

Unter "Enzym" sind in der hier beschriebenen Ausführungsform sowohl Enzyme zu verstehen, die homogen gereinigt sind, als auch biologische Proben, in denen die zu untersuchende Enzymaktivität vermutet wird. Beim Einsatz derartiger biologischer Proben kommt der besondere Vorteil des Verfahrens bzw. der erfindungsgemäßen Peptidderivate gegenüber einigen im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zum Tragen, daß auch biologische Proben, wie beispielsweise Rohextrakte, Körperflüssigkeiten, Kulturüberstände, etc., die relativ ungereinigt sind, verwendet werden können.

"Biologische Proben" im Sinne des Verfahrens können auch mehr als ein enzymatisch aktives Molekül enthalten. D.h. in solchen biologischen Proben kommt die Summe der Molekülspezies zum Tragen, die zur Gesamtaktivität der Probe in positiver wie in negativer Hinsicht beitragen. Damit ist gemeint, daß die biologische Probe ein Gemisch aus einem oder mehreren Enzymen und einem oder mehreren Molekülen, die inhibierend oder aktivierend auf das oder die Enzyme wirken können, umfassen kann.

Unter "Enzym" ist im Zusammenhang mit dem vorliegenden Verfahren neben Proteinen oder Proteinen mit nicht-proteinogenen Cofaktoren (Enzyme im engeren Sinne) auch andere organische Makromoleküle gemeint, die enzymatische Reaktionen katalysieren können. "Enzymatisch" bedeutet in dem Zusammenhang, im Gegensatz zur chemischen Katalyse, die Katalyse einer Reaktion in der für Enzyme typischen Weise. Vorzugsweise bedeutet dies, daß die Substratspezifität die stereochemischen Eigenschaften von Substraten einschließt. Unter "anderen organischen Makromolekülen" sind beispielsweise Ribozyme oder synthetische Makromoleküle mit enzymatischer Aktivität, sogenannte Synzyme, zu verstehen. Die Menge des eingesetzten Enzyms variiert je nach spezifischer Aktivität der Probe. Der Fachmann ist in der Lage, durch Verdünnen oder Konzentrieren einer Probe Reihen verschiedener Konzentrationen herzustellen, um die Probe, vorausgesetzt sie enthält eine Aktivität, in einen Meßbereich zu bringen, der einen Vergleich der

Kinetiken des Übergangs vom verspannten in den nicht verspannten Zustand des Peptidderivats mit und ohne Enzym erlaubt.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens betrifft die Verwendung von Standardenzymen, wie sie beispielsweise kommerziell erhältlich sind, die eine definierte Enzymaktivität besitzen. Mit Hilfe solcher Standardenzyme ist es dem Fachmann möglich, durch Herstellen einer Verdünnungsreihe und Messung deren Aktivitäten mit dem hier beschriebenen Verfahren Standardkinetikkurven zu erhalten, die einen Vergleich mit zu untersuchenden Enzymproben erlauben, um damit quantitative Aussagen zu der gemessenen Enzymaktivität zu erzielen.

In Schritt (a) des hier beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens werden je zwei Reaktionsansätze hergestellt, die sich untereinander nur darin unterscheiden, daß der eine Ansatz die zu untersuchende Enzymprobe enthält, der andere nicht. Als Mindestanforderung enthalten diese Reaktionslösungen in jeweils für die Enzymreaktion geeigneten Mengen:

- ein für dieses Verfahren vorgesehenes erfindungsgemäßes Peptidderivat als Substrat,
- Wasser,
- Pufferbestandteile und gegebenenfalls
- Cofaktoren oder andere Komponenten.

Einem der beiden Reaktionsansätze wird zusätzlich die Enzymprobe zugegeben. In dem anderen Ansatz kann die durch die fehlende Enzymprobe entstandene Volumendifferenz durch Zugabe von Wasser oder Puffer ausgeglichen werden.

Die nach Zusammenmischen in der Reaktionslösung enthaltenen Komponenten liegen vorzugsweise in gelöster Form vor. Zur Herstellung der Reaktionsansätze in geeigneten Reaktionsgefäßen sind die Komponenten unter größtmöglicher Durchmischung zuzugeben. Die Mischung kann bereits durch geeignete, dem Fachmann geläufige Pipettiertechniken erreicht werden. Zusätzlich kann durch mechanische Einwirkung, beispielsweise durch vortexen, schwenken oder schütteln, der Mischeffekt verbessert werden.

Vorzugsweise sieht das erfindungsgemäße Verfahren vor, die nach Mischung aller notwendigen Komponenten, einschließlich des Enzyms in dem Ansatz mit Enzym, erzeugten Reaktionsansätze über eine gewisse Zeit, beispielsweise 5, 10, 20 oder

30 Minuten zu inkubieren, bevor die Reaktion gestartet wird. Eine solche Vorinkubation dient der Optimierung der Mischung, vorzugsweise um eine homogene Mischung zu erzielen.

Während oder nach dem Mischen der Reaktionsansätze werden diese auf die Reaktionsbedingungen eingestellt, unter denen die Reaktion ablaufen soll. Dies betrifft im besonderen die Temperatur. Auch hierzu ist die vorgenannte Vorinkubation sinnvoll, um in den Reaktionsansätzen bereits zum Start der Reaktion gleichmäßige und reproduzierbare Reaktionsbedingungen zu erreichen.

In Schritt (b) wird die Reaktion durch Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 in dem eingesetzten erfindungsgemäßen Peptidderivat gestartet. Die in diesem Schritt gestartete Reaktion umfaßt in beiden Ansätzen den Übergang des eingesetzten Peptidderivats vom verspannten in den nicht verspannten Zustand. Zusätzlich umfaßt die Reaktion in dem Ansatz mit Enzym die zu messende enzymatische Reaktion. Das Lösen der B1-B2-Bindung wird durch eine der vorgenannten Maßnahmen erzielt. Vorzugsweise wird diese Maßnahme sowohl im Reaktionsansatz mit Enzym als auch in demjenigen ohne Enzym durchgeführt, um möglichst identische Reaktionsbedingungen in den beiden Reaktionslösungen zu gewährleisten.

In Schritt (c) wird während der ablaufenden Reaktion das von dem eingesetzten Peptidderivaten ausgesendete optische Signal gemessen.

Die Messung erfolgt nach spektroskopischen Verfahren und mit hierzu geeigneten Geräten, die dem Fachmann bekannt und in der Literatur beschrieben sind, beispielsweise in dem "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals", R.P. Haugland, ISBN 0-9652240-0-7. Die optischen Signale werden bei der Messung in elektrische Signale umgewandelt, wobei analoge elektrische Signale vorzugsweise zum Zwecke der besseren Auswertbarkeit digitalisiert werden.

Wenn das eingesetzte Peptidderivat Fluoreszenzfarbstoffe trägt (A und D), so wird einer der Farbstoffe, oder beide, durch Licht einer geeigneten Wellenlänge angeregt. Das emittierte langwelligere Licht wird detektiert, wobei es durch geeignete Filtersysteme vom anregenden Licht abgetrennt wird. Enthalten die Gruppierungen A und D im eingesetzten Peptidderivat Farbstoffe, die eine enzymabhängige Farbänderung zeigen, so kann die Detektion durch die Messung der Absorption des

von einer geeigneten Lichtquelle emittierten Lichts nach Durchgang durch die Reaktionslösungen erfolgen.

Die Messung des optischen Signals erfolgt vorzugsweise vom Start der Reaktion an (Schritt b) oder kurz davor, bis eine von beiden oder beide Reaktionen eine gewisse Sättigung erreicht haben. Die Messung kann auch schon vorher abgebrochen werden, wenn die Messdaten beispielsweise schon vorher keine Aktivität für das zu untersuchende Enzym anzeigen. Die Sättigung einer Reaktion läßt sich daran erkennen, daß die kinetische Kurve eine Plateauphase erreicht. Wie bereits weiter oben beschrieben, hängt die Kinetik der Reaktion im wesentlichen von der endogenen Übergangsgeschwindigkeit des eingesetzten Peptidderivats ab. Zusätzlich geht die Reaktionstemperatur in die Reaktionsgeschwindigkeit ein. Durchschnittlich liegt die Dauer eines Enzymtests bis zur Sättigung zwischen einer und zwanzig Minuten.

Einer der besonderen Vorteile der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines kontinuierlichen Meßverfahrens für Enzymaktivitäten. Daher ist es prinzipiell möglich, unbegrenzt viele Meßwerte je Zeiteinheit aufzunehmen. Allerdings sollte beachtet werden, daß die Menge der aufgenommenen Daten in einem vernünftigen Verhältnis stehen zu ihrer Aussagekraft und der erforderlichen Größe des kostenintensiven Datenspeicherplatzes. Bevorzugte Zeitabstände für die einzelnen Meßpunkte liegen zwischen 300 und 6 Messungen pro Minute, so daß je nach Zeitdauer des Enzymtests ca. 100-1000 Datenpunkte je Messung erhalten werden.

Das Ergebnis der in Schritt (c) beschriebenen Messung ist vorzugsweise eine Kurve, in der die Stärke des optischen Signals gegen die Zeit aufgetragen wird. Werden in dem vorliegenden Verfahren Peptidderivate verwendet, bei denen der Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand detektiert werden kann, so zeigen beide Kurven, für die Reaktionsansätze mit und ohne Enzym, einen Anstieg des optischen Signals. Wenn das zu messende Enzym eine Aktivität aufweist, so zeigt die Kurve bei dem Reaktionsansatz mit Enzym einen stärkeren Anstieg als die Kurve zu dem Reaktionsansatz ohne Enzym (vergl. Kurven 1 und 4 in Fig. 1 und 2).

In Schritt (d) wird die Aktivität des untersuchten Enzyms durch Bestimmen der Differenz der Geschwindigkeiten der Änderung des optischen Signals in den Reaktionslösungen mit und ohne dem Enzym bestimmt. Bei der Änderung des optischen Signals handelt es sich vorzugsweise um eine Zunahme des optischen

Signals. Bei dem optischen Signal handelt es sich vorzugsweise um ein Fluoreszenz- oder ein Farbsignal.

Bei der Bestimmung der Enzymaktivität anhand der gemessenen kinetischen Kurven, muß man wie in Schritt (c) (oben) zwei Fälle unterscheiden:

- (i) Wenn die Änderung des optischen Signals auf unterschiedliche Geschwindigkeiten des Übergangs vom verspannten in den nicht verspannten Zustand in den Reaktionslösungen mit und ohne Enzym beruht, dann kann man die Enzymaktivität wie folgt aus der Differenz dieser Übergangsgeschwindigkeiten ermitteln. Für einige Anwendungen genügt eine qualitative Aussage, ob enzymatische Aktivität vorliegt oder nicht. Solche Aussagen lassen sich bereits durch visuellen Vergleich der Kurven treffen. Quantitative Aussagen lassen sich beispielsweise durch exakte, vorzugsweise rechnergestützte Analysen der kinetischen Kurven treffen. Die Übergangsgeschwindigkeit ist in der Kurve ausgedrückt durch ihre Steigung:

$$\text{Übergangsgeschwindigkeit } v = \frac{d [\text{optischesSignal}]}{dt}$$

Um den Sättigungseffekt bei der Berechnung der Übergangsgeschwindigkeiten weitestgehend auszuschließen, sollte die Steigung an einer Stelle der Kurve errechnet werden, die in einem möglichst linearen Bereich liegt. Dieser lineare Bereich liegt vorzugsweise möglichst nah am Startpunkt der Reaktion, wie z.B. in dem Bereich unterhalb von 10% des maximalen optischen Signals. Durch die Steigung der Kurve an einem bestimmten Punkt läßt sich die momentane Übergangsgeschwindigkeit ausdrücken. Die Differenz von zwei Kurven läßt sich durch die Subtraktion der Übergangsgeschwindigkeit an vergleichbaren Punkten der beiden Kurven beispielsweise Meßpunkte zum gleichen Zeitpunkt oder zur gleichen Höhe des optischen Signals, ermitteln. Vorzugsweise sollte die gleiche Höhe des optischen Signals zum Vergleich von Übergangsgeschwindigkeiten herangezogen werden. Durch die Korrelation des maximalen optischen Signals mit der Stoffmenge des eingesetzten Substrats, das vollständig umgewandelt wurde (beispielsweise als nicht verspanntes Peptidderivat) und des optischen Signals beim Start der Reaktion mit der Stoffmenge 0 des umgesetzten Substrats, läßt sich die relative Angabe des optischen Signals in

absolute Stoffmengen umrechnen. Dadurch lassen sich die Übergangsgeschwindigkeiten auch als absolute momentane Umsatzraten (Einheit: mol/sec) ausdrücken. Durch Subtraktion von zwei momentanen Umsatzraten an vergleichbaren Meßpunkten der beiden Kurven, vorzugsweise auf gleicher Höhe der Fluoreszenz, ergibt sich als Differenz der Übergangsgeschwindigkeiten die Aktivität des Enzyms.

Neben der oben aufgeführten Möglichkeit der Linearisierung der Anstiege (unterhalb von 10% des maximalen optischen Signals) können vorzugsweise die Daten der gesamten Reaktionszeit oder -kurve zur Berechnung des Substratumsatzes und damit der Übergangsgeschwindigkeit eingesetzt werden. Hierzu kann man entsprechende, dem Fachmann geläufige Auswertesoftware zur Berechnung von "First-Order-Kinetiken" verwenden. Es wird also das Konzentrations-Zeitgesetz einer Reaktion erster Ordnung benutzt. Zur Berechnung der Reaktionskonstanten werden Datensammelraten verwendet, die folgendem Zeitgesetz entsprechen:

$$Dsz = \ln(1-A)/k \text{ mit } A = (1 - \exp^{-k \cdot gZ})/Dp.$$

Es bedeuten:

Dsz = Zeit, zu der ein Meßpunkt zur Berechnung herangezogen wird;

k = kinetische Konstante einer Reaktion erster Ordnung;

gZ = gesamte Reaktionszeit, über die die Reaktion beobachtet wird; und

Dp = Anzahl aller Datenpunkte, mit der die Reaktion beschrieben wird.

Mittels dieser Datenpunkte können nun die genauen kinetischen Konstanten mittels üblicher Algorithmen berechnet werden.

- (ii) Wenn die Gruppierungen A und D des eingesetzten Peptidderivats Farbstoffe enthalten, die eine enzymabhängige Farbänderung zeigen, so ergibt sich die enzymatische Aktivität direkt aus der Kurvensteigung der Kurve der Reaktionslösung mit Enzym, da die Kurve zu der Reaktionslösung ohne Enzym im Idealfall keine Steigung hat. Die Übergangsgeschwindigkeit und damit vorzugsweise die Enzymaktivität läßt sich nach einem der oben beschriebenen Verfahren berechnen. Sollte aus experimentellen Gründen die Kurve zur Reaktionslösung ohne Enzym von der x-Achse-Parallelen abweichen, beispielsweise weil der Farbstoff nicht 100%ig stabil ist, so kann man diese Kurve zur Korrektur der enzymmessenden Kurve einsetzen,

beispielsweise indem man die Meßwerte die an denselben Zeitpunkten aufgenommen wurden, voneinander abzieht.

Das Verfahren dieser Ausführungsform der Erfindung ist hervorragend zur Anwendung in Massensuchtests, sogenannten High-Throughput-Screenings, geeignet. Techniken zur automatisierten Manipulation der Reaktionslösungen in Reaktionsgefäßen durch Roboter, automatisierten Detektion und Auswertung sind dem Fachmann geläufig und sind beispielsweise beschrieben in "Drug Metabolism: Databases and High-Throughput Testing During Drug Design and Development"; P.W. Erhardt (Editor) (1999), Blackwell Science Inc, ISBN: 0632053429; "Cost-Effective Strategies for Automated and Accelerated High-Throughput Screening" (Ibcs Biomedical Library Series) (1996), IBC United States Conferences, ISBN: 1579360025; "High-Throughput Screening; The Discovery of Bioactive Substances" (1997), ISBN 0-8247-0067-8; "New Challenges Arising from High Throughput Screening", Dixon, G.K.; Major, J.S.; Rice, M.J. (1995), ISBN 1-85996-111-8.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung, ob ein Effektor ein Inhibitor oder ein Aktivator eines Enzyms ist, für das die erfindungsgemäßen Peptidderivate oder Teile davon ein Substrat darstellen, wobei vorzugsweise die Peptidderivate bei geschlossener Bindung zwischen B1 und B2 kein oder zumindest ein schlechtes Substrat darstellen, bestehend aus den Schritten

- (a) Mischen geeigneter Mengen des Peptidderivats und des Enzyms in jeweils einer für die Aktivität des Enzyms geeigneten Reaktionslösung mit und ohne dem Effektor;
- (b) Starten der Reaktion durch Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat;
- (c) Messen des optischen Signals in Abhängigkeit von der Zeit; und
- (d) Feststellen, daß der Effektor
 - (i) ein Inhibitor ist, wenn die Geschwindigkeit der Änderung des optischen Signals in der Reaktionslösung mit dem Effektor kleiner ist als in der Reaktionslösung ohne dem Effektor; oder
 - (ii) ein Aktivator ist, wenn die Geschwindigkeit der Änderung des optischen Signals in der Reaktionslösung mit dem Effektor größer ist als in der Reaktionslösung ohne dem Effektor.

"Effektoren" sind in der vorliegenden Ausführungsform definiert als Moleküle, die auf eine bestimmte enzymatische Aktivität einen Einfluß als Inhibitor oder Aktivator haben. "Inhibitoren" sind definiert als Moleküle, die eine bestimmte enzymatische Aktivität hemmen. "Aktivatoren" sind definiert als Moleküle, die eine bestimmte enzymatische Aktivität verstärken. Die nach dem vorliegenden Verfahren analysierbaren Effektoren gehören zu allen möglichen Stoffklassen, die sich aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften für das Verfahren eignen. Diese Eigenschaften betreffen vor allem die Löslichkeit des Effektors. Zu den analysierbaren Effektoren gehören sowohl anorganische als auch organische Moleküle, vorzugsweise jedoch organische Moleküle. Die Effektoren können durch chemische Synthese oder durch Isolierung aus natürlichen Quellen, wie beispielsweise Lebewesen bereitgestellt werden. Bevorzugt handelt es sich bei den Effektoren um Nucleinsäuren, Lipide, Kohlehydrate, (Poly)Peptide oder Kombinationen aus diesen Molekülgruppen. Besonders bevorzugt handelt es sich bei den analysierbaren Effektoren um Peptide oder Polypeptide oder Derivate davon. Insbesondere bevorzugt umfassen die Effektoren Moleküle, die bekanntermaßen mit Enzymen interagieren, wie beispielsweise Peptidinhibitoren, Antikörper, Lektine oder Fragmente oder Derivate davon, deren inhibierende oder aktivierende Aktivität in dem vorliegenden Verfahren getestet werden soll.

Vorzugsweise sind die analysierbaren Effektoren in der Lage, das Enzym und/oder Peptidderivat zu binden. Solche Bindungen erfolgen vorzugsweise an das aktive Zentrum des Enzyms oder an andere zugängliche Stellen des Enzyms, wobei letzteres zu allosterischen Effekten auf die Enzymaktivität führen kann.

Das in der vorliegenden Ausführungsform dargestellte Verfahren entspricht im wesentlichen der Beschreibung des vorgenannten Verfahrens zur Bestimmung der Aktivität eines Enzyms. Der wesentliche Unterschied hierzu betrifft die Tatsache, daß die zwei in Schritt (a) zu Vergleichszwecken hergestellten Reaktionslösungen nicht mit oder ohne Enzym hergestellt werden, sondern mit und ohne Effektor. Abgesehen davon sind die Ausführungsbeschreibungen zu Schritt (a), (b) und (c) des vorgenannten Verfahrens auch auf das Verfahren der Bestimmung, ob ein Effektor ein Inhibitor oder ein Aktivator ist, anwendbar.

Die mittels Schritt (c) durch Messen des optischen Signals erhältlichen kinetischen Kurven werden in Schritt (d) ausgewertet und ermöglichen die Feststellung, ob ein

eingesetzter Effektor ein Inhibitor oder ein Aktivator ist. Die Vorgehensweise beim Vergleich der Kurven entspricht der Vorgehensweise in der vorgenannten Ausführungsform. Beruht die Änderung des optischen Signals auf dem Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand des eingesetzten Peptidderivats, kann ebenfalls die Übergangsgeschwindigkeit der jeweiligen Reaktion durch die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten nach einem Konzentrations-Zeitgesetz einer Reaktion erster Ordnung bestimmt werden. Der relative Unterschied zwischen den gemessenen Übergangsgeschwindigkeiten gibt Aufschluß über die Aktivität des Effectors. Liegt die Übergangsgeschwindigkeit des Ansatzes mit Effektor unter derjenigen des Ansatzes ohne Effektor, handelt es sich bei dem Effektor um einen Inhibitor des Enzyms. Im umgekehrten Fall, wenn die Übergangsgeschwindigkeit im Ansatz mit Effektor über der Übergangsgeschwindigkeit des Ansatzes ohne Effektor liegt, handelt es sich bei dem Effektor um einen Aktivator.

Als dritte Möglichkeit ist in dieser Ausführungsform die Möglichkeit eingeschlossen, daß der eingesetzte Effektor keinerlei inhibitorische oder aktivierende Aktivität auf das untersuchte Enzym besitzt. In diesem Fall unterscheiden sich die Kinetiken der Reaktion mit und ohne Effektor nicht signifikant. Signifikante Unterschiede liegen beispielsweise vor, wenn sich die Übergangsgeschwindigkeiten, beispielsweise ausgedrückt durch Geschwindigkeitskonstanten, um mehr als den doppelten statistischen Fehler des Basiswerts unterscheiden.

Die hier beschriebene Ausführungsform der Erfindung schließt die Möglichkeit ein, das Verfahren zur Bestimmung, ob ein Effektor ein Inhibitor oder ein Aktivator ist, und das Verfahren zur Bestimmung der Aktivität eines Enzyms zu kombinieren. Dies bedeutet, daß zu den beiden Reaktionslösungen in Schritt (a) eine dritte angesetzt wird, so daß in dem Verfahren der vorliegenden Ausführungsform neben zwei enzymenthaltenden Reaktionslösungen (mit und ohne Effektor) eine Reaktionslösung ohne Enzym teilnimmt. Auf diese Weise erhält man zusätzlich zu den Kurven für die Reaktionslösungen mit und ohne Effektor eine Null-Wertkurve für die Kinetik des Peptidderivats ohne Enzym. Diese Kombination der beiden Verfahren bietet sich vorzugsweise für die Fälle an, bei denen die Änderung des optischen Signals auf dem Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand beruht. Durch die Null-Wertkurve ist es möglich, den Unterschied zwischen den Kurven mit Effektor und ohne Effektor in Beziehung zu setzen mit dem Unterschied

zwischen Null-Wertkurve und der Kurve ohne Effektor, also der Kurve, die die enzymspezifische Aktivität anzeigt. Auf diese Weise ist eine relative Quantifizierung der aktivierenden oder inhibitorischen Wirkung eines Effektors möglich. Beispiele für derartige Kurven sind in den Fig. 1 und 2 gezeigt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Screening eines Inhibitors oder eines Aktivators eines Enzyms, für das die erfindungsgemäßen Peptidderivate oder Teile davon ein Substrat darstellen, wobei vorzugsweise die Peptidderivate bei geschlossener Bindung zwischen B1 und B2 kein oder zumindest ein schlechtes Substrat darstellen, bestehend aus den Schritten

- (a) Mischen geeigneter Mengen des Peptidderivats und des Enzyms in jeweils einer für die Aktivität des Enzyms geeigneten Reaktionslösung mit und ohne einer Probe, die eine einzelne oder eine Vielzahl von Verbindungen enthält, die Kandidaten für einen Inhibitor oder Aktivator sind;
- (b) Starten der Reaktion durch Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat;
- (c) Messen des optischen Signals in Abhängigkeit von der Zeit, und
- (d) Feststellen, daß die Probe
 - (i) inhibitorische Aktivität besitzt, wenn die Geschwindigkeit der Änderung des optischen Signals in der Reaktionslösung mit der Probe kleiner ist als in der Reaktionslösung ohne der Probe; oder
 - (ii) aktivierende Aktivität besitzt, wenn die Geschwindigkeit der Änderung des optischen Signals in der Reaktionslösung mit der Probe größer ist als in der Reaktionslösung ohne der Probe.

Zusätzlich betrifft die Erfindung als bevorzugte Ausführungsform ein Verfahren, das die vorgenannten Schritte (a) bis (d) umfaßt und zusätzlich den Schritt:

- (e) Unterteilen der Probe, für die in Schritt (d) inhibitorische oder aktivierende Aktivität festgestellt wurde, und Wiederholen der Schritte (a) bis (d), bis der in der Probe enthaltene Inhibitor oder Aktivator gereinigt vorliegt.

"Screening" bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Durchmusterung einer Vielzahl von Proben, die eine einzelne oder eine Vielzahl von Verbindungen enthalten, die Kandidaten für Inhibitoren oder Aktivatoren des vorgegebenen Enzyms darstellen, mit dem Ziel, Inhibitoren oder Aktivatoren des Enzyms zu identifizieren. Im allgemeinen bedeutet "Screening" ein Verfahren, bei dem eine Vielzahl von Proben auf eine bestimmte Eigenschaft hin untersucht wird, von denen man nicht weiß, wie sie auf die zu testende Eigenschaft reagieren.

Unter "Probe" sind sämtliche natürlichen oder künstlichen Proben zu verstehen, die Kandidaten für Inhibitoren oder Aktivatoren des vorgegebenen Enzyms enthalten und in dem erfindungsgemäßen Verfahren getestet werden können. Darunter fallen sowohl homogene Lösungen eines Moleküls als auch Gemische mehrerer Moleküle. Unter Molekülen, die in dem Verfahren durchmustert werden können, sind die als Effektoren gekennzeichneten Moleküle der vorgenannten Ausführungsform eingeschlossen. Die Proben können natürlichen Quellen entnommen sein oder synthetisch hergestellt sein. Beispielsweise können die Proben Molekülbibliotheken entnommen werden, wie sie beispielsweise für Oligopeptide oder Naturstoffe existieren. Desweiteren können Proben auch durch Aufschlüsse biologischen Materials, beispielsweise Lebendmaterial oder ehemals lebendiges Material, entnommen werden oder Kulturüberständen von Mikroorganismenkulturen entstammen. Die Proben können als Rohextrakt oder -überstand vorliegen oder können in einer frei zu wählenden Reinigungsform vorliegen. Zur Reinigung können die Extrakte oder Überstände fraktioniert werden. Hierfür stehen dem Fachmann zahlreiche Techniken zur Verfügung, wie beispielsweise differenzielle Fällung, Gradientenzentrifugation, Chromatographietechniken, etc. Das biologische Material umfaßt sämtliche Organismenbereiche, wobei das Material entweder kultiviert oder der Natur entnommen sein kann.

Das in der vorliegenden Ausführungsform beschriebene Verfahren schließt die Ausführungsbeschreibungen für die Schritte (a) bis (b) des Verfahrens zur Bestimmung, ob ein Effektor ein Inhibitor oder ein Aktivator ist mit ein, wobei hierbei anstelle eines Effektors eine Probe untersucht wird. Ebenso läßt auch dieses Verfahren eine Kombination mit dem oben beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der Aktivität eines Enzyms zu, so daß man zusätzlich zu den

kinetischen Kurven, die die Enzymmessung mit und ohne Probe reflektieren, eine Messung ohne Enzym vornimmt, die eine Null-Wertkurve ergibt.

Das durch den Schritt (e) erweiterte Screening-Verfahren betrifft Anwendungen, bei denen die Ausgangsproben Gemische von verschiedenen Molekülen sind, die Kandidaten für Inhibitoren oder Aktivatoren darstellen.

Es betrifft solche Proben, für die in Schritt (d) eine inhibitorische oder aktivierende Aktivität festgestellt wurde. Solche Proben werden dann nach einer dem Fachmann bekannten Technik in chemische oder biologische Fraktionen unterteilt. Die Fraktionierung erfolgt nach ein oder mehreren physikalischen, chemischen oder biologischen Eigenschaften, wie etwa Löslichkeit, Molekülmasse, elektrische Ladung, Affinität, Hydrophobizität, etc. Diese Fraktionen werden wiederum dem durch die Schritte (a) bis (d) charakterisierten Screening-Verfahren unterzogen. Diese Abfolge, bestehend aus Unterteilen und Screening, kann mehrmals wiederholt werden, bis ein durch den Anwender festgelegter Reinheitsgrad erreicht ist. Ein solcher Reinheitsgrad kann sich durch einen Anreicherungsgrad der spezifischen inhibitorischen oder aktivierenden Aktivität ausdrücken. Der Reinheitsgrad kann auch durch für die jeweilige Molekülklassen, die die Probe enthält, geeignete qualitative oder quantitative Nachweisverfahren bestimmt werden. Beispiele für derartige Nachweisverfahren sind HPLC, Gaschromatographie, Massenspektrometrie, Dünnschichtchromatographie, Gelchromatographie, Blotverfahren, etc. Dem Fachmann sind derartige Nachweisverfahren geläufig.

Eine besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft die vorgenannten Verfahren, wobei die Änderung des optischen Signals zumindest teilweise auf dem Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand des Peptidderivates beruht.

Wie bereits ausführlich für die jeweiligen Verfahren beschrieben, kann die Änderung des optischen Signals auf dem Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand des für die Verfahren vorgesehenen erfindungsgemäßen Peptidderivats beruhen.

"Teilweise" bedeutet hierbei, daß in den Reaktionslösungen, die ein Enzym enthalten, das optische Signal zusätzlich durch die enzymatische Aktivität geändert werden kann, beispielsweise wenn die enzymatische Aktivität eine Trennung der

Gruppierungen A und D des Peptidderivats oder eine Trennung des in A oder D enthaltenen Farbstoffs vom restlichen Peptidderivat katalysiert.

Dieser besondere Fall wird durch eine weitere besondere Ausführungsform der Erfindung erfaßt, die die vorgenannten Verfahren betrifft, wobei die Änderung des optischen Signals bei Enzymreaktionen mit Enzym zumindest teilweise auf der Trennung der chemischen Verbindung zwischen den Gruppierungen A und D des Peptidderivats oder auf der Trennung des in A oder D enthaltenen Farbstoffs vom restlichen Peptidderivat beruht.

Wie bereits für einige Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung beschrieben, kann ein Teil oder die Gesamtheit der Detektion der enzymatischen Aktivität auf der Trennung der chemischen Verbindung zwischen den Gruppierungen A und D des Peptidderivats oder auf der Trennung des in A oder D enthaltenen Farbstoffs vom restlichen Peptidderivat beruhen. In jedem Fall bewirkt die Aktivität des getesteten Enzyms oder der Probe, die eine solche Enzymaktivität enthält, diese Trennung.

Wie bereits oben mehrfach geschehen, ist die Beschreibung dieser bevorzugten Ausführungsform nach den der Detektion zugrundeliegenden Prinzipien getrennt zu betrachten:

- Wenn die Änderung des optischen Signals auf einer enzymabhängigen Farbänderung basiert, wirkt die enzymatische Aktivität meist direkt auf den Farbstoff. Dabei kann es zu einer Abtrennung von A und/oder D bzw. eines in A und/oder D enthaltenen Farbstoffs vom Peptidderivat kommen. Dies kann anhand des Beispiels 2 verdeutlicht werden. Durch Chymotrypsin wird p-Nitroanilin (NHNP) abgespalten. Dies führt erfindungsgemäß zur Trennung eines Farbstoffs in D vom restlichen Peptidderivat. Die Freisetzung von p-Nitroanilin kann als Farbänderung bei 390 nm beobachtet werden. In Beispiel 2 fungiert NHNP allerdings als Quencher und die Fluoreszenz von Abz wird detektiert.
- Wenn die Änderung des optischen Signals zumindest teilweise auf dem Übergang des eingesetzten erfindungsgemäßen Peptidderivats vom verspannten in den nicht verspannten Zustand beruht und diese durch einen Quench-Effekt detektiert wird, so kann die chemische Trennung der in A und D enthaltenen Farbstoffe in der vorliegenden bevorzugten Ausführungsform zu einer Steigerung der Fluoreszenz gegenüber dem nicht verspannten Zustand des Peptidderivats

führen. Die räumliche Trennung der in A und D enthaltenen Farbstoffe durch Aufhebung der chemischen Verbindung bewirkt eine maximale Verminderung des Quench-Effekts. Der besondere Vorteil dieser Ausführungsform liegt darin, daß das Signal, das die enzymatische Aktivität anzeigt, sich gegenüber dem Signal für die Reaktion ohne Enzym besonders abhebt. Man kann hierbei von einem Verstärkungseffekt sprechen.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die vorgenannten Verfahren, wobei die Reaktionslösung in Schritt (a) zur Homogenität vermischt wird.

Wie bereits weiter oben beschrieben, betrifft eine hervorragende Eigenschaft der Erfindung die Tatsache, daß sämtliche für einen Testansatz zur Messung eines Enzyms notwendigen Komponenten, einschließlich des Substrats, vor dem Start der Reaktion zusammengemischt werden können. Weiterhin wurde bereits ausgeführt, daß das in Schritt (a) der erfindungsgemäßen Verfahren definierte Mischen vorzugsweise zu einer homogenen Mischung der Komponenten führt, falls nötig durch Einhalten einer Vorinkubationszeit.

"Homogene Mischung" bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Lösung, deren Stoffbestandteile gleichmäßig (homogen) innerhalb des Volumens, welches die Lösung einnimmt, verteilt sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die vorgenannten Verfahren, wobei das Enzym eine Protease, Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerase, Kinase, Phosphatase, Glykosidase oder Lipase/Esterase ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit umfassend das erfindungsgemäße Peptidderivat, eine Vorrichtung oder ein Reagens zum Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat, eine oder mehrere Pufferlösungen, ein oder mehrere Enzyme, für die das Peptidderivat ein Substrat darstellt, und/oder eine Anleitung zur Durchführung eines oder mehrerer der oben beschriebenen Verfahren.

Das Kit umfaßt sämtliche Komponenten, die in dem Kit enthalten sind, das weiter oben beschrieben wurde, und zusätzlich eine Anleitung zur Durchführung eines oder mehrerer der vorgenannten Verfahren.

Eine solche Anleitung enthält die in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung enthaltenen Ausführungsbeschreibungen, die es dem Anwender erlauben, das oder die erfindungsgemäße(n) Verfahren zu nutzen. Zusätzlich kann die Anleitung Angaben aus dem Stand der Technik enthalten, die dem Anwender die Durchführung bestimmter Techniken erleichtern.

Eine weitere besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Peptidderivats oder des erfindungsgemäßen Kits zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen oder zur Identifizierung von Inhibitoren oder Aktivatoren von Enzymen.

Diese und andere Ausführungsformen sind dem Fachmann offenbart und offensichtlich und sind umfaßt durch die Beschreibung und die Beispiele der vorliegenden Erfindung. Weiterführende Literatur kann zu einer der oben angeführten Methoden, Mittel und Verwendungen, die im Sinne der vorliegenden Erfindung angewendet werden können, dem Stand der Technik entnommen werden, z.B. aus öffentlichen Bibliotheken, z.B. unter der Benutzung von elektronischen Hilfsmitteln. Zu diesem Zweck bieten sich unter anderem öffentliche Datenbanken an wie die "Medline", die über Internet zur Verfügung stehen, z.B. unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Weitere Datenbanken und Adressen sind dem Fachmann geläufig und können aus dem Internet entnommen werden, z.B. unter der Adresse <http://www.lycos.com>. Eine Übersicht über Quellen und Informationen zu Patenten bzw. Patentanmeldungen in der Biotechnologie ist in Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 gegeben.

Die Figuren zeigen:

Figur 1 zeigt Registriertkurven des Übergangs vom verspannten in den nicht verspannten Zustand des in Beispiel 1 verwendeten Peptidderivats in Reaktionslösungen ohne Enzym (4), mit Enzym (1) und zwei verschiedenen Effektoren, die inhibitorisch auf die enzymatische

Aktivität wirken (2,3). Die als Enzym eingesetzte Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerase PIN 1 katalysiert den Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand, der bei dem eingesetzten Peptidderivat auf der cis/trans-Isomerisierung der Phosphoseryl-Prolyl-Peptidbindung beruht.

Figur 2 zeigt Registrierkurven verschiedener Kinetiken einer Protease (α -Chymotrypsin), deren Aktivität mit Hilfe des Peptidderivats aus Beispiel 2 gemessen wurde. Der Anstieg der Fluoreszenz in der Reaktionslösung ohne Enzym (4), geht ausschließlich auf den Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand zurück, der bei dem eingesetzten Peptidderivat auf der cis/trans-Isomerisierung der Alanyl-Prolyl-Peptidbindung zurückzuführen ist. Bei den Reaktionslösungen mit Enzym beruht der Anstieg der Fluoreszenz zusätzlich zum Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand auf der proteolytischen Abspaltung von p-Nitroanilin (NHNp) vom Peptidderivat (1 bis 3). Im Vergleich zu der Reaktionslösung mit Enzym und ohne Effektor (1) zeigen die Reaktionen mit zugesetzten inhibitorisch wirksamen Effektoren deutlich niedrigere Übergangsgeschwindigkeiten (2 und 3).

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Methodischer Hintergrund

Die in den nachfolgenden Beispielen verwendeten Peptidderivate wurden im wesentlichen nach dem Festphasen-Peptidsynthese-Verfahren unter Verwendung von Fluorenyloxycarbonyl-geschützten Aminosäure-Derivaten mit einem automatischen Peptidsynthetisierer hergestellt. Als Ausgangsprodukte dienten kommerziell erhältliche Aminosäuren bzw. Fluorochrome, die an den Seitengruppen geschützt sind. Die Addition der Aminosäuren erfolgte mit einer Effizienz von 95-98% je Additionsschritt. Die Schutzgruppen wurden anschließend durch 96% Trifluoressigsäure/2% Wasser/2% Tributylsilan/2% Phenol entfernt. Die Aufreinigung

der Peptidderivate erfolgte durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Nutzung eines Acetonitril/Wasser-Gradienten-Systems. Der Reinheitsgrad der erhaltenen Peptidderivate wurde durch analytische HPLC und durch Kapillarelektrophorese bestimmt. Die Identität der Verbindungen wurde durch massenspektrometrische Methoden geprüft. Zur Erzeugung des verspannten Zustands wurde in den aufgereinigten Peptidderivaten eine Disulfidbrückenbindung zwischen den für B1 und B2 enthaltenen Cysteinen induziert, wie in Albericio (Int. J. Peptide Prot. Res. 37 (1991), 402) beschrieben.

Beispiel 1: Bestimmung der Wirkung von Effektoren auf eine Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerase

Folgende Lösungen werden hergestellt:

- Substratlösung: 2 mg/ml Abz-Cys-Ser(PO₃)-Pro-Ala-Cys-Phe-NHNp (SEQ ID NO:2) in DMSO (Abz: Aminobenzoesäure; NHNp: para-Nitroanilin)
- Enzymlösung: 5 mM Lösung von humanem PIN1 in 50 mM Hepes-Puffer, pH 7.5
- Effektorlösungen: 0.1 mg/ml Juglon Substanz in DMSO
- Starterlösung: 250 mM DTT in 50 mM Hepes-Puffer, pH 7.5

In eine handelsübliche Titerplatte mit 384 Reaktionskammern werden je Kammer 2 µl Substratlösung, 1 µl Effektorlösung und 20 µl Enzymlösung pipettiert. In den Kontrollansätzen mit und ohne Enzym, beide jeweils ohne Effektor, werden die Enzym- und Effektorlösungen durch entsprechende Volumina 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 bzw. DMSO ersetzt. Zur Minderung von Pipettierfehlern kann es von Vorteil sein, aus den entsprechenden Mengen Enzym- und Substratlösung eine solche Mischung zu erzeugen, daß beim Pipettieren von 22 µl dieser Mischung je Kammer die gleichen Konzentrationen erreicht werden, wie beim Pipettieren der Einzelvolumina. Die Platte wird dann bei 6°C über eine Vorinkubationszeit von 20 Minuten so gelagert, daß jede der Reaktionskammern nach 20 Minuten eine

Temperatur von 6°C aufweist. Die eigentliche Reaktion wird durch Zugabe von jeweils 20 µl Starterlösung gestartet.

Bei sachgemäßer Temperaturkonstanz von 6°C während der Meßzeit und dem Erreichen einer homogenen Durchmischung der Reaktionslösungen enthaltend Substrat-, Enzym- und Effektorlösung mit der Starterlösung lassen sich bei Anregung der Fluoreszenz mit einer UV-Lampe mit einem Anregungsspektralbereich zwischen 250 und 330 nm in jeder einzelnen Reaktionskammer die Zunahme von sichtbarem Licht bei 420 nm registrieren. Bereits der visuelle Vergleich der erhaltenen Registrierkurven (Fig. 1) ermöglicht die Identifikation von Effektoren, die in dem vorliegenden Beispiel eindeutig inhibitorisch auf das Enzym PIN I wirken.

Beispiel 2: Bestimmung der Wirkung von Effektoren auf eine Protease

Folgende Lösungen werden hergestellt:

- Substratlösung: 2 mg/ml Abz-Cys-Ala-Pro-Ala-Cys-Phe-NHNp (SEQ ID NO:3) in DMSO
- Enzymlösung: 1 nM Lösung von α -Chymotrypsin in 50 mM Hepes-Puffer, pH 7.5
- Effektorlösungen: 0,1 mg/ml Eglin C in DMSO
- Starterlösung: 250 mM DTT in 50 mM Hepes-Puffer, pH 7.5

In eine handelsübliche Titerplatte mit 384 Reaktionskammern werden je Kammer 2 µl Substratlösung, 1 µl Effektorlösung und 20 µl Enzymlösung pipettiert. In den Kontrollansätzen mit und ohne Enzym, beide jeweils ohne Effektor, werden die Enzym- und Effektorlösungen durch entsprechende Volumina 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 bzw. DMSO ersetzt. Zur Minderung von Pipettierfehlern kann es von Vorteil sein, aus den entsprechenden Mengen Enzym- und Substratlösung eine solche Mischung zu erzeugen, daß bei Pipettieren von 22 µl dieser Mischung je Kammer die gleichen Konzentrationen erreicht werden, wie beim Pipettieren der Einzelvolumina. Die Platte wird dann bei 30 °C über eine Vorinkubationszeit von 20 Minuten so gelagert, daß jede der Reaktionskammern nach 20 Minuten eine Temperatur von 30

°C aufweist. Die eigentliche Reaktion wird durch Zugabe von jeweils 20 µl Starterlösung gestartet.

Bei sachgemäßer Temperaturkonstanz von 30 °C während der Meßzeit und dem Erreichen einer homogenen Durchmischung der Reaktionslösungen enthaltend Substrat-, Enzym- und Effektorlösung mit der Starterlösung lassen sich bei Anregung der Fluoreszenz mit einer UV-Lampe mit einem Anregungsspektralbereich zwischen 250 und 330 nm in jeder einzelnen Reaktionskammer die Zunahme von sichtbarem Licht bei 420 nm registrieren. Bereits der visuelle Vergleich der erhaltenen Registrierkurven (Fig. 2) ermöglicht die Identifizierung von Effektoren, die in dem vorliegenden Beispiel eindeutig inhibitorisch auf α -Chymotrypsin wirken.

Beispiel 3: Screening nach Enzymaktivitäten mit Substratspezifität für Peptidderivate, die in dem durch geschlossene Bindung zwischen B1 und B2 stabilisierten verspannten Zustand vorliegen

Es wurde beobachtet, daß beispielsweise Proteasen, wie z.B. Chymotrypsin, allerdings in sehr hohen Konzentrationen dazu in der Lage sind, Peptidderivate anzugreifen, die durch geschlossene B1-B2-Bindung stabilisiert im verspannten Zustand vorliegen. Dieser Befund gab Anlaß, nach Enzymen zu suchen, die solche verspannten Peptide bevorzugen. Dazu wurden folgende Lösungen hergestellt:

Substratlösung I: 2 mg/ml Abz-Cys-Ala-Pro-Ala-Cys-Tyr(NO₂)-NH₂ (SEQ ID NO:4) in DMSO.

(Tyr(NO₂): meta-Nitrotyrosin)

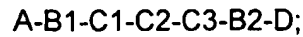
Substratlösung II: zu 100 ml 35 mM Hepes-Puffer (pH 7.6) werden 20 µl Substratlösung I gegeben.

Die Substratlösung II ist bei Raumtemperatur ca. 8 Stunden stabil. Es werden Fraktionen biologischer Lösungen eingesetzt, in denen eine enzymatische Aktivität vermutet wird, die geeignet ist, entweder die Bindung zwischen B1 und B2 zu lösen oder aber zumindest eine der Verbindungen A und D vom Peptidderivat abzuspalten. In eine handelsübliche Titerplatte mit 384 Reaktionskammern werden je Kammer 10 µl biologische Lösung pipettiert. Nach Equilibrieren der Titerplatte bei

Raumtemperatur für 20 min wird die Reaktion durch Zugabe von 60 µl Substratlösung II gestartet. Bei sachgemäßer homogener Durchmischung der Lösungen lassen sich bei Anregung der Fluoreszenz mit einer UV-Lampe mit einem Anregungsspektralbereich zwischen 250 und 330 nm in jeder einzelnen Reaktionskammer die Zunahme von sichtbarem Licht bei 420 nm registrieren. Der visuelle Vergleich der erhaltenen Registrierkurven dient dem Auffinden einer Enzymaktivität, deren Substrat die verspannte Substratform ist.

Ansprüche

1. Peptidderivat mit der allgemeinen Formel



wobei C1, C2 und C3 Verbindungen sind, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aminosäuren, N-Alkyl-Aminosäuren, Peptiden, Peptidderivaten, Peptoiden und Verbindungen, die sich in Peptidketten einbauen lassen;

wobei B1 und B2 Verbindungen sind, die untereinander eine chemische Bindung ausbilden können;

wobei bei Ausbildung der Bindung zwischen B1 und B2 das Peptidderivat in einem verspannten Zustand vorliegt;

wobei sich die Bindung zwischen B1 und B2 leicht lösen läßt und der verspannte Zustand daraufhin in einen nicht verspannten Zustand übergeht; und

wobei A und D Gruppierungen sind, die die Messung des Übergangs vom verspannten in den nicht verspannten Zustand oder die direkte Messung einer Enzymreaktion aufgrund der Änderung eines optischen Signals erlauben.

2. Peptidderivat nach Anspruch 1, wobei B1 und B2 jeweils Cystein ist.
3. Peptidderivat nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Verfahren zur Lösung der Bindung zwischen B1 und B2 die Anwendung eines Lichtblitzes oder einer anderen elektromagnetischen Strahlung oder die Zugabe eines chemischen Reagens ist.
4. Peptidderivat nach Anspruch 3, wobei das chemische Reagens eine reduzierende Verbindung ist.

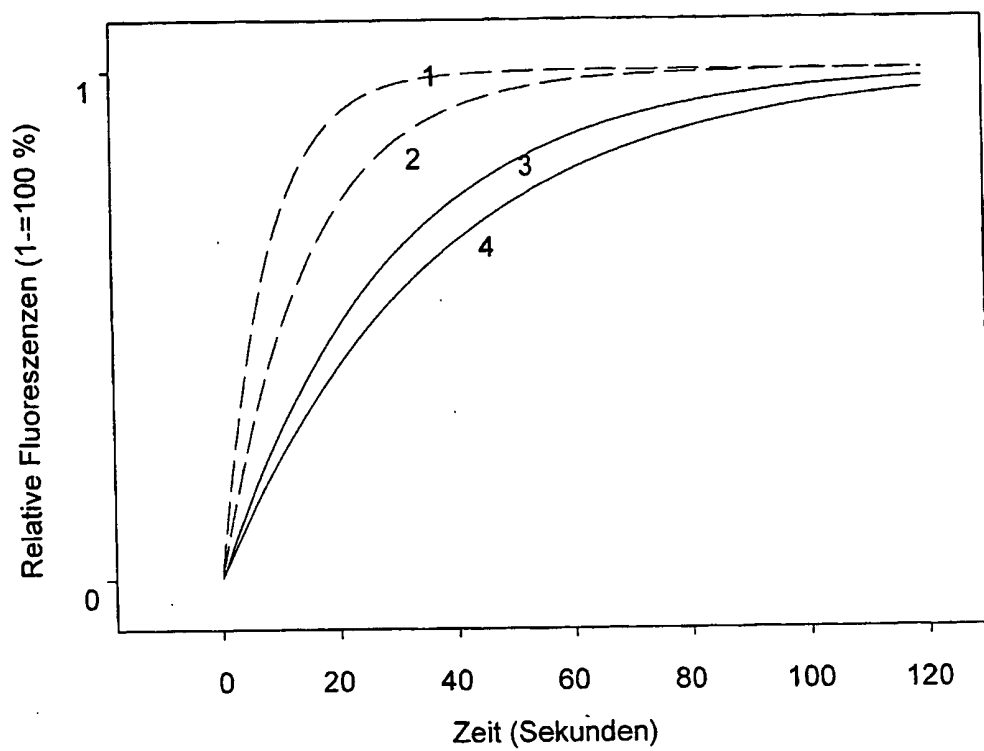
5. Peptidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei A und D Gruppierungen sind, die Farbstoffe enthalten, die bei Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge fluoreszieren, oder Gruppierungen sind, die Farbstoffe enthalten, die eine Farbänderung zeigen.
6. Peptidderivat nach Anspruch 5, wobei sich die Fluoreszenz der in den Gruppierungen enthaltenen fluoreszierenden Farbstoffe im verspannten Zustand des Peptidderivats durch einen Quench-Effekt aufhebt oder vermindert.
7. Peptidderivat nach Anspruch 6, wobei A eine Gruppierung ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: 2-Aminobenzoessäure, D,L-2-Amino-3-(7-methoxy-4-cumaryl)propansäure, Coumarin, Quinolinon, 4-(4'-Dimethylaminobenzenazo)benzoessäure (Dabsyl) und 5-(2'-Aminoethylamino)naphtalensulfonsäure (EDANS); und D eine Gruppierung ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: 4-Nitroanilin, Aminoacyl-4-Nitroanilin, 3-Nitrotyrosin, Aminoacyl-3-Nitrotyrosin, Tryptophan und Aminoacyl-Tryptophan.
8. Peptidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei sich das optische Signal, das von A und D ausgeht, sich zusätzlich zum verspannten und nicht verspannten Zustand des Peptidderivats von dem Zustand unterscheidet, der vorliegt, wenn die chemische Verbindung zwischen A und D oder zwischen einem in A oder D enthaltenen Farbstoff und dem restlichen Peptidderivat durch enzymatische Katalyse getrennt wurde.
9. Peptidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der verspannte Zustand die cis-Konformation mindestens einer der chemischen Bindungen innerhalb der Verbindungen C1 bis C3 ist und der nicht verspannte Zustand die trans-Konformation der Bindung ist.

10. Peptidderivat nach Anspruch 9, wobei die Bindung eine Peptidbindung zwischen der Aminogruppe eines Prolinrests oder eines Derivats davon und der Carboxygruppe der benachbarten Aminosäure ist.
11. Peptidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das Peptidderivat auch im verspannten Zustand für eine zu testende Enzymaktivität ein Substrat darstellt.
12. Kit umfassend das Peptidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, eine Vorrichtung oder ein Reagens zum Lösen der Verbindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat, eine oder mehrere Pufferlösungen und/oder ein oder mehrere Enzyme, für die das Peptidderivat ein Substrat darstellt.
13. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität eines Enzyms, für das das Peptidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 10 oder Teile davon ein Substrat darstellt, bestehend aus den Schritten
 - (a) Mischen einer geeigneten Menge des Peptidderivats nach einem der Ansprüche 1 bis 10 in jeweils einer für die Aktivität des Enzyms geeigneten Reaktionslösung mit und ohne dem Enzym;
 - (b) Starten der Reaktion durch Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat;
 - (c) Messen des optischen Signals in Abhängigkeit von der Zeit; und
 - (d) Bestimmen der Aktivität des Enzyms durch Bestimmen der Differenz der Geschwindigkeiten der Änderung des optischen Signals in den Reaktionslösungen mit und ohne dem Enzym.
14. Verfahren zur Bestimmung, ob ein Effektor ein Inhibitor oder ein Aktivator eines Enzyms ist, für das das Peptidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 10 oder Teile davon ein Substrat darstellt, bestehend aus den Schritten
 - (a) Mischen geeigneter Mengen des Peptidderivats nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und des Enzyms in jeweils einer für die Aktivität des Enzyms geeigneten Reaktionslösung mit und ohne dem Effektor;

- (b) Starten der Reaktion durch Lösen der Verbindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat;
 - (c) Messen des optischen Signals in Abhängigkeit von der Zeit; und
 - (d) Feststellen, daß der Effektor
 - (i) ein Inhibitor ist, wenn die Geschwindigkeit der Änderung des optischen Signals in der Reaktionslösung mit dem Effektor kleiner ist als in der Reaktionslösung ohne dem Effektor; oder
 - (ii) ein Aktivator ist, wenn die Geschwindigkeit der Änderung des optischen Signals in der Reaktionslösung mit dem Effektor in der Reaktionslösung mit dem Effektor größer ist als in der Reaktionslösung ohne dem Effektor.
15. Verfahren zum Screening eines Inhibitors oder eines Aktivators eines Enzyms, für das das Peptidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 10 oder Teile davon ein Substrat darstellt, bestehend aus den Schritten
- (a) Mischen geeigneter Mengen des Peptidderivats nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und des Enzyms in jeweils einer für die Aktivität des Enzyms geeigneten Reaktionslösung mit und ohne einer Probe, die eine einzelne oder eine Vielzahl von Verbindungen enthält, die Kandidaten für einen Inhibitor oder Aktivator sind;
 - (b) Starten der Reaktion durch Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat;
 - (c) Messen des optischen Signals in Abhängigkeit von der Zeit, und
 - (d) Feststellen, daß die Probe
 - (i) inhibitorische Aktivität besitzt, wenn die Geschwindigkeit der Änderung des optischen Signals in der Reaktionslösung mit dem Effektor in der Reaktionslösung mit der Probe kleiner ist als in der Reaktionslösung ohne der Probe; oder
 - (ii) aktivierende Aktivität besitzt, wenn die Geschwindigkeit der Änderung des optischen Signals in der Reaktionslösung mit dem Effektor der Reaktionslösung mit der Probe größer ist als in der Reaktionslösung ohne der Probe.

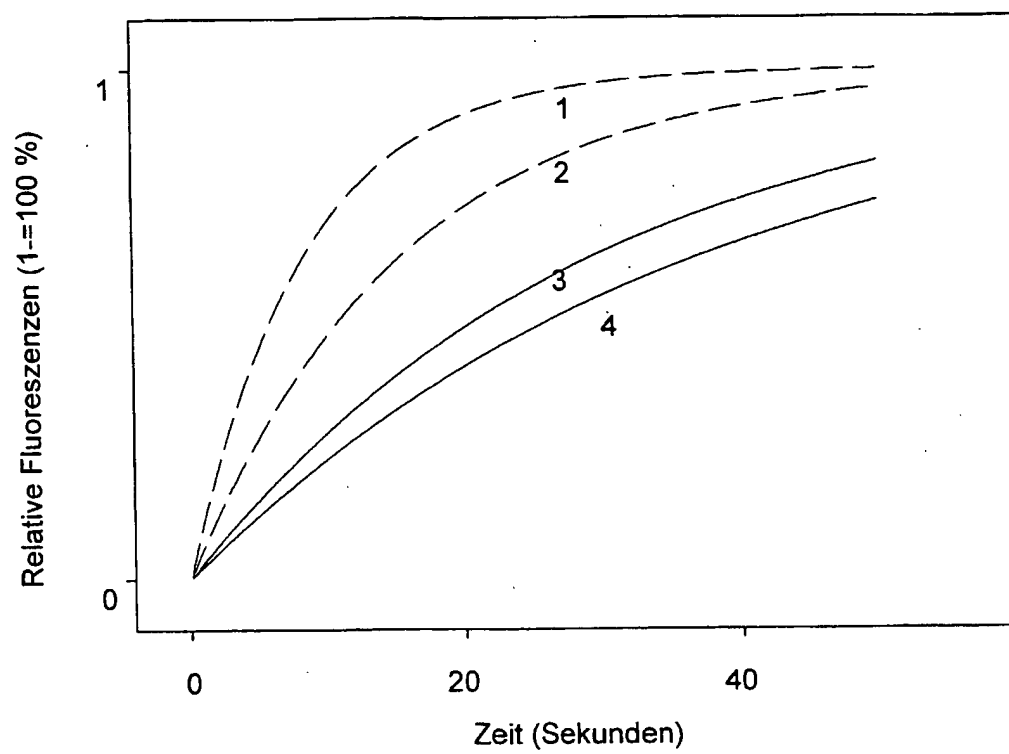
16. Verfahren nach Anspruch 16, zusätzlich umfassend den Schritt
(e) Unterteilen der Probe, für die in Schritt (d) inhibitorische oder aktivierende Aktivität festgestellt wurde, und Wiederholen der Schritte (a) bis (d), bis der in der Probe enthaltene Inhibitor oder Aktivator gereinigt vorliegt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei die Änderung des optischen Signals zumindest teilweise auf dem Übergang vom verspannten in den nicht verspannten Zustand des Peptidderivats beruht.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei die Änderung des optischen Signals bei Enzymreaktionen mit Enzym zumindest teilweise auf der Trennung der chemischen Verbindung zwischen den Verbindungen A und D des Peptidderivats oder auf der Trennung des in A oder D enthaltenen Farbstoffs vom restlichen Peptidderivat beruht.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei die Reaktionslösung in Schritt (a) zur Homogenität vermischt wird.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 19, wobei das Enzym eine Protease, Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerase, Kinase, Phosphatase, Glykosidase oder Lipase/Esterase ist.
21. Kit umfassend das Peptidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, eine Vorrichtung oder ein Reagens zum Lösen der Bindung zwischen B1 und B2 im Peptidderivat, eine oder mehrere Pufferlösungen, ein oder mehrere Enzyme, für die das Peptidderivat ein Substrat darstellt, und/oder eine Anleitung zur Durchführung des oder der Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 20.
22. Verwendung des Peptidderivats nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder des Kits nach Anspruch 12 oder 21 zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen oder zur Identifizierung von Inhibitoren oder Aktivatoren von Enzymen.

1/2



Figur 1

2/2



Figur 2

1/2

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

<120> Peptidsubstrate zur direkten Messung enzymatischer
Aktivitäten

<130> D 2297 PCT

<150> 100 23 743.6

<151> 2000-05-15

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz; synthetisch,
keine natürliche Abstammung

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> N-terminal gebundene Aminobenzoesäure

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)

<223> PHOSPHORYLATION

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)

<223> C-terminal gebundenes para-Nitroanilin

<400> 1

Cys Ala Ser Pro Cys
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch,
keine natürliche Abstammung

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> N-terminal gebundene Aminobenzoesäure

<220>

<221> MOD_RES

2/2

<222> (2)
<223> PHOSPHORYLATION

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> C-terminal gebundenes para-Nitroanilin

<400> 2
Cys Ser Pro Ala Cys Phe
1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch,
keine natürliche Abstammung

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> N-terminal gebundene Aminobenzoesäure

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> C-terminal gebundenes para-Nitroanilin

<400> 3
Cys Ala Pro Ala Cys Phe
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch,
keine natürliche Abstammung

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> N-terminal gebundene Aminobenzoesäure

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> C-terminal gebundenes meta-Nitrotyrosin

<400> 4
Cys Ala Pro Ala Cys
1 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)